N° d'ordre: 2760

THESE DE DOCTORAT D'ETAT

présentée à

L'UNIVERSITE DE PARIS-SUD
CENTRE D'ORSAY

pour obtenir le grade de

DOCTEUR ES-SCIENCES NATURELLES

par

André-Christian FERAULT

Sujet :

LES PARTICULES DE TYPE VIRAL ASSOCIEES A *Gaeumannomyces graminis* (SACC.) ARX ET OLIVIER

SONT-ELLES RESPONSABLES DE MODIFICATIONS DU POUVOIR PATHOGENE DU CHAMPIGNON ?

Soutenue le 21 septembre 1983 devant la Commission d'Examen

MM.	Jean	CHEVAUGEON	Président
	Jacques	PONCHET	Rapporteur
	Pierre	CORNUET	Examinateurs
	Alain	COLENO	Examinateurs
	Jean	MARROU	Examinateurs
	Jean	PERNES	Examinateurs
	Frantz	RAPILLY	Examinateurs
	Didier	SPIRE	Membre invité

UNIV.
LIBRARY
UCSF.

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41543524_0008

THESE DE DOCTORAT D'ETAT

[illegible]

[illegible]

[illegible]

[illegible]

DOCTEUR ES-SCIENCES NATURELLES

[illegible]

[illegible]

[illegible]

[illegible]

[illegible]	[illegible]	[illegible]	Président
	[illegible]	[illegible]	Rapporteur
	[illegible]	[illegible]	
	[illegible]	[illegible]	
	[illegible]	[illegible]	Examinateurs
	[illegible]	[illegible]	
	[illegible]	[illegible]	
	[illegible]	[illegible]	[illegible]

THESE DE DOCTORAT D'ETAT

présentée à

L'UNIVERSITE DE PARIS-SUD
CENTRE D'ORSAY

pour obtenir le grade de

DOCTEUR ES-SCIENCES NATURELLES

par

André-Christian FERAULT

Sujet :

LES PARTICULES DE TYPE VIRAL ASSOCIEES A *Gaeumannomyces graminis* (SACC.) ARX ET OLIVIER

SONT-ELLES RESPONSABLES DE MODIFICATIONS DU POUVOIR PATHOGENE DU CHAMPIGNON ?

Soutenue le 1983 devant la Commission d'Examen

MM. Jean	CHEVAUGEON	Président
Jacques	PONCHET	Rapporteur
Pierre	CORNUET	Examinateurs
Alain	COLENO	
Jean	MARROU	
Jean	PERNES	
Frantz	RAPILLY	
Didier	SPIRE	Membre invité

"Les Hommes ont l'habitude, chaque fois qu'ils découvrent une ressemblance entre deux choses, de leur attribuer à l'une et à l'autre, même en ce qui les distingue, ce qu'ils ont reconnu vrai de l'une d'elles".

René DESCARTES

in *Regulae ad directionem ingenii*

Cette thèse a été préparée à la Station de Pathologie végétale INRA de Versailles dans le cadre du travail que nous avons réalisé sur les "virus associés à des champignons" depuis une quinzaine d'années, avec Didier SPIRE.

L'étude des virus présents chez Gaeumannomyces graminis a débuté, pour nous, en 1977 et a constitué une activité de collaboration fort agréable avec la Station INRA de Rennes et, essentiellement, avec Bernard TIVOLI que je remercie chaleureusement et très cordialement, et Jean-Marc LEMAIRE.

Je tiens à rendre un hommage respectueux et reconnaissant à Monsieur le Professeur Jean CHEVAUGEON qui m'a permis de présenter en thèse cette partie de travail. Je le remercie beaucoup de ses conseils constructifs.

Je suis particulièrement heureux que Jacques PONCHET ait accepté d'être rapporteur, lui qui travailla la partie mycologique de ce sujet et avec lequel je poursuis maintenant une très intéressante collaboration mycovirale.

J'exprime ma gratitude à Pierre CORNUET et lui témoigne ici respect et reconnaissance.

Je remercie chaleureusement les autres membres du jury : Alain COLENO, Jean MARROU, Jean PERNES, Frantz RAPILLY et Didier SPIRE qui occupent des fonctions si prenantes, mais ont bien voulu me faire l'honneur de juger le texte qui suit.

Un travail de laboratoire suppose des collaborations et je remercie ceux qui ne m'ont pas ménagé leurs concours : Marcelle BOISSONNET-MENES, Aline BUILLET, Euphrosyne MICHON et mon ami Jean BERTRANDY.

Ma gratitude va aussi à ceux qui ont permis la présentation matérielle de ce travail et qui sont, par ailleurs, souvent mis à contribution pour des préparations de documents ou publications : Denise CHARTRAIN, Mauricette DELRIEU, Nicole MENARD, Jean-Pierre BELLEI et Daniel ROLLAND, ainsi qu'à Evelyne RON, du Service de Traduction.

J'adresse des remerciements tout particuliers à Christine GUILLARD qui a assuré la dactylographie.

Merci à tous ceux qui ont contribué à l'élaboration de cette thèse que je dédie affectueusement à Madina, Valentine et Martin.

SOMMAIRE

	Pages
SUMMARY	1
PRESENTATION DU SUJET	3
1 - INTRODUCTION	7
1.1. L'agent pathogène et sa biologie	7
1.2. La maladie, son évolution et les méthodes de lutte	9
1.3. Les particules de type viral (PTV) associées à *Gaeumannomyces graminis*	14
OBJET ET PROGRAMME DE TRAVAIL	20
2 - MATERIEL ET METHODES	22
2.1. Le champignon	22
2.1.1. Les souches : origine, isolement, milieux de culture	22
2.1.2. Caractères de croissance, agressivité et fructification sexuée	24
2.2. Les particules de type viral	26
2.2.1. Méthodes de purification et de concentration	26
2.2.2. Microscopie électronique	33
2.2.3. Etude sérologique	33
2.2.4. Expression des résultats	36
3 - RESULTATS	37
3.1. Analyse du contenu viral d'isolats mycéliens en relation avec certains aspects de la biologie du champignon	38
3.2. Evolution de certains aspects de la biologie et du contenu viral d'isolats mycéliens	41
3.3. Evolution du contenu viral lors de la reproduction sexuée du champignon	45
3.4. Transmission des particules virales à une souche "saine"	50
3.5. Influence des conditions de culture et de conservation du champignon sur le contenu viral	55

.../...

3.5.1. Conditions de culture 55

3.5.2. Conditions de conservation 59

3.6. Essais de "guérison" de souches virosées par voies physique et chimique 60

3.6.1. Traitements thermiques 60

3.6.2. Traitements chimiques 65

3.7. Mise en évidence de particules virales chez *Phialophora radicicola* et étude de leurs relations avec les éléments viraux contenus dans *G. graminis* 75

4 - DISCUSSION CONCLUSIVE 83

CONDENSE 89

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES 96

-:-:-:-:-:-:-:-:-:-:-

SUMMARY

DO VIRUS-LIKE PARTICLES ASSOCIATED TO *GAEUMANNOMYCES GRAMINIS* (SACC) ARX ET OLIVIER INDUCE CHANGES IN THE PATHOGENICITY OF THE FUNGUS ?

The purpose of this work was to consider the relations between biological modifications of take-all isolates from small grains (*G. graminis* var. *tritici*) and their virus-like particles content (VLP of 26 and 35 nm). The results obtained indicate that :

- the aggressive isolates may or may not contain VLP while all the hypoaggressive ones do contain them.

- the aggressivity of the fungus kept *in vitro* decreases over a period of time that varies with each isolate. Outcome of viruses is inpath with the reduction in aggressivity level but slightly ahead of it. The relative amount of VLP increases with conservation time.

- the viral condition of most of the monoascospored isolates is compatible with a high degree of aggressivity.

Viral replication is strongly dependent on fungus cultural conditions. Tests involving the direct infection of virus-free isolate protoplasts lead to the derepression of the viral replication, which suggests the latent character of the viruses. Attempts to induce the "recovery" of viral isolates by thermal or chemical treatment induce but a decrease in the amount of existing VLP. These effects are stopped as soon as their causes disappear.

VLP were found in *Phialophora radicicola* Cain var. *graminicola* and *radicicola*, a vegetative form of *G. graminis* according to some authors. One type is homologous in both fungi. Tests involving the reciprocal transmission of VLP by direct method gave no successful results.

After comparing our results to those of other workers, we found that the relations between fungus characteristics (especially fungus pathogenesis) and VLP content were not clearly established. Nevertheless, some findings are of interest, mainly the parallel evolution between decreasing aggressivity and increasing amount of viruses.

The "model" *G. graminis*-associated VLP, which is now well known for viruses, can no longer be regarded as a major reference of mycovirology for agricultural purposes. Consequently, further approaches to the determinism of changes in pathogenicity of this fungus should be developed.

PRESENTATION DU SUJET

L'accroissement de la productivité des cultures céréalières - notamment du Blé - au cours des vingt à trente dernières années, a été spectaculaire, au moins dans les pays à agriculture "développée". En France, l'exemple du Blé est fréquemment cité : son rendement s'est amélioré, en moyenne, de un quintal par hectare et par an, depuis 1950. Les potentialités nouvelles offertes par la sélection et l'application de certaines techniques culturales, rapidement vulgarisées,donnent à ces productions des attraits multiples non seulement dans les régions spécialisées, mais encore dans les zones dites marginales.

Le temps limité consacré à leur culture, la mécanisation totale des opérations, l'existence de prix garantis et attractifs ainsi que l'élargissement des utilisations au domaine de l'alimentation animale, sont autant d'éléments qui incitent l'agriculteur à accroître la part des céréales dans l'assolement et donc,à réduire les rotations. Cette évolution peut aboutir à la répétition de la culture sur le même sol pendant plusieurs années. On parle alors de "monoculture", terme peu approprié au cas des céréales à paille dans notre pays où ces productions sont rarement répétées plus de trois à quatre années.

Toutefois, ce temps suffit à révéler les inconvénients des rotations insuffisantes, particulièrement dans le domaine de la Pathologie végétale. En effet, la concentration et la répétition des mêmes cultures accroissent les risques phytosanitaires. Pour les parasites présents sur les parties aériennes des plantes tels que Charbons, Helminthosporioses, Oïdium, Rhynchosporiose, Rouilles, Septorioses,..., l'application des traitements chimiques de semences et/ou en végétation et l'amélioration des résistances, permettent de réduire notablement les dégâts. Il n'en est pas de même pour d'autres maladies dont le maintien dans le sol est assuré : tel est le cas du Piétin-échaudage, causé par *Gaeumannomyces graminis* (SACC.), ARX et OLIVIER, maladie répandue et qui provoque des

.../...

pertes de récolte certes irrégulières, mais souvent importantes.

La répétition des cultures de céréales lui fournit un support favorable à son maintien. La seule voie de lutte actuellement possible consiste en l'application de méthodes et techniques culturales appropriées. Un phénomène est cependant observé en cas de culture continue : les dégâts s'accroissent les premières années jusqu'à atteindre un maximum entre la seconde et la quatrième, puis reviennent en deçà d'un seuil dit de nuisibilité. Une méthode de lutte biologique de protection croisée(PONCHET, 1982) basée sur l'utilisation des souches hypoagressives du champignon mises en évidence au cours du "déclin" de la maladie est étudiée, en particulier,par les chercheurs de la Station de Pathologie végétale INRA de Rennes et d'Avignon.

Une des hypothèses avancées pour expliquer ce phénomène repose sur la modification des souches présentes du parasite, par acquisition de particules de type viral (PTV).

La découverte de virus (*) chez *G. graminis* remonte à une douzaine d'années (LAPIERRE et al. et LEMAIRE et al., 1970). A cette époque, des éléments viraux avaient été observés chez le champignon de couche et quelques champignons microscopiques. Les relations présumées entre l'hôte et le parasite impliquaient, dans l'esprit des chercheurs, l'existence de possibilités de réduction du pouvoir pathogène des champignons affectant les végétaux, par utilisation de ces mycovirus.

(*) La terminologie de groupe des "virus associés à des champignons" est délicate pour deux raisons :

- ils présentent une diversité de forme et de composition ; certains ne sont pas encapsidés,
- leurs transmission par voie "directe" n'ayant pas été réussie (est-ce dû seulement à des raisons techniques ?), leur pouvoir infectieux n'a pu être mis en évidence.

Aussi, les termes "particules de type viral" (PTV) et mycovirus (parfois plasmides) sont-ils employés. Néanmoins, afin de simplifier l'exposé, il nous arrivera d'utiliser "virus" et "particules virales".

.../...

Ces recherches sont maintenant effectuées depuis une vingtaine d'années et des PTV ont été mises en évidence chez plus de 100 espèces de champignons appartenant à une soixantaine de genres répartis dans les cinq grands groupes de la classification. Une quarantaine d'espèces phytopathogènes sont concernées (RAWLINSON et BUCK, 1981).

Il en reste certainement beaucoup à découvrir dans la mesure où des recherches, pratiquées au hasard, aboutissent à 10-15 p. 100 d'échantillons virosés. Par ailleurs, 20 p. 100 environ des isolats éprouvés renferment des ARN bicaténaires (ARNbc) (HOLLINGS, 1982).

La plupart de ces virus sont des particules isodiamétriques de 25 à 45 nm de diamètre dont le poids moléculaire est compris entre 6 et 13 x 10^6 daltons et renferment de 1 à 10 segments d'ARNbc (de 2 à 8,5 x 10^6 daltons au total).

Une certaine diversité est toutefois notée avec quelques représentants d'autres types : par exemple, particules à enveloppe (*Endothia parasitica* - NEWHOUSE et al., 1983), à ARNmc et bacilliformes (*Agaricus bisporus*), à ADNbc (*Rhizidiomyces apophysatus*), cités par SAKSENA et LEMKE, 1978 et L'HOSTIS, 1982 ou encore ARNbc seul (*Rhizoctonia solani*, CASTANHO et al., 1978).

La plupart semblent avirulents dans la mesure où ils ne provoquent pas de "symptômes" chez les champignons qui les renferment. Dans le cas contraire, les résultats obtenus en matière de relations entre caractères du champignon (vitesse de croissance modifiée, lyse, production de toxines, pouvoir pathogène réduit ou augmenté,...) et présence de PTV, doivent être considérés avec précaution en raison de leur éventuelle nature fortuite (les comparaisons ne sont pas effectuées entre des isolats isogéniques). En effet, la transmission "directe" des PTV n'a pas été réussie de façon formelle chez les champignons microscopiques (HOLLINGS, 1982), mais seulement latéralement (par anastomose hyphale, fusion de protoplastes, ...) ou verticalement (par la descendance sexuée ou asexuée) (LECOQ et al., 1979).

Cependant, certains disposent d'une information supérieure au nécessaire à leur réplication, mais dont la (les) fonction(s) est (sont) spéculative(s) (GHABRIAL, 1980 ; RAWLINSON et BUCK, 1981).

Quelques exemples font exception et sont largement cités (au point de devenir "pédagogiques" selon L'HOSTIS, 1982). Il s'agit, en premier lieu, des systèmes "killer" de *Saccharomyces cerevisiae* (VODKIN et ALIANELL, 1978) et *Ustilago maydis* (KOLTIN et LEVINE, 1978) : des ARNbc spécifiques constituent les déterminants génétiques de la production de protéines toxiques (facteurs "killer") pour les isolats sensibles de ces espèces ou de champignons reliés ; ces ARNbc "satellites" n'ont pas de fonctions virales et sont répliqués seulement en présence des ARNbc viraux.

Chez *Helminthosporium victoriae*, les isolats hypoagressifs contiennent deux virus, dont l'un n'est jamais présent dans les isolats agressifs (SANDERLIN et GHABRIAL, 1978 ; GHABRIAL, 1980).

Par ailleurs, d'autres hypothèses ont été émises quant à l'origine de la réduction du pouvoir pathogène de champignons : présence de certains ARN bicaténaires non associés à des particules virales chez *Endothia parasitica* (CASTANHO et al., 1978 ; GRENTE, 1980), et, très récemment, particules à enveloppe dans les seules souches hypoagressives (NEWHOUSE et al., 1983) par exemple, ou présence de plasmides de type bactérien chez *Rhizoctonia solani* ou *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* (GRIMALDI et al., 1978).

Le travail présenté pour cette thèse prend place dans une activité consacrée par le laboratoire aux "virus associés à des champignons", depuis 1968. Il correspond à une collaboration initiée en 1977 avec la Station de Pathologie végétale INRA de Rennes (MM.TIVOLI et LEMAIRE), à un moment où les résultats obtenus par les différentes équipes en matière de relations (caractères du champignon - contenu en virus) étaient très contradictoires.

-:-:-:-:-:-:-:-:-:-:-

INTRODUCTION

1.1. L'AGENT PATHOGENE ET SA BIOLOGIE

Décrit pour la première fois par SACCARDO en 1875 sous le nom de *Raphidophora graminis*, le champignon agent du Piétin-échaudage des céréales est ensuite appelé *Ophiobolus graminis* Sacc. C'est un Ascomycète Ascoloculaire (les périthèces sont des loges intrastromatiques), de l'ordre des Pseudosphaeriales et de la famille des Pléosporacées.

En 1952, ARX et OLIVIER le classent dans un nouveau genre : *Gaeumannomyces* de l'ordre des Diaporthales qui appartient au groupe des Ascohyméniaux (les périthèces et les paraphyses dérivent directement des filaments de l'archicarpe). Dans le texte, on utilisera l'abréviation *G. graminis*.

Les hyphes mycéliennes ont de 4 à 7 µm de large et les cellules contiennent de un à huit noyaux (CHAMBERS et FLENTJE, 1967). Ce mycélium porte fréquemment des phialides qui libèrent des phialospores monocellulaires incapables de germer (WESTE, 1972) ou capables et semblables à celles produites par *Phialophora radicicola* Cain (LEMAIRE et PONCHET, 1963).

La forme sexuée est représentée par des périthèces noirs, globuleux, de 200 à 400 µm de diamètre, terminés par un col. Les asques sont unituniqués. A maturité, leur paroi disparaît, libérant huit ascospores de 80 à 125 µm de long, hyalines, filiformes, pluricellulaires.

Une importance mise au point taxonomique récente est due à WALKER (1981).

Trois variétés de ce parasite ont été décrites par WALKER (1973, 1975 et 1981). On les distingue notamment par leur gamme d'hôtes, la morphologie des hyphopodes et la taille des ascospores :

.../...

- *G. graminis* var. *graminis* attaque surtout le Riz ; il est fréquent en régions tropicales,

- *G. graminis* var. *tritici* WALKER affecte la plupart des céréales ; il est mondialement répandu,

- *G. graminis* var. *avenae* (TURNER) DENNIS est pathogène pour l'Avoine et d'autres graminées ; il a été mis en évidence dans différents pays des régions tempérées.

La forme *tritici* provoque le Piétin-échaudage des céréales à paille (appelé "Wheat take-all fungus" ou encore "Take-all", par les auteurs anglo-saxons). Cette variété sera la seule utilisée dans notre étude.

Gaeumannomyces graminis présente une vie saprophytique et un développement parasitaire.

Le champignon se conserve sur des fragments de végétaux tels que racines et chaumes. Sa durée de survie est faible. GARRETT (1970) observe qu'elle est au maximum de trente deux semaines après son incorporation au sol. Des apports d'azote allongent sensiblement cette durée. Son pouvoir de colonisation est très faible (BUTLER, 1953) : *G. graminis* ne possède pas de formes de conservation et il est peu compétitif vis-à-vis d'autres organismes.

L'infection est généralement réalisée par le mycélium : une première phase assure sa fixation au niveau des poils absorbants de la plante et conduit à la formation d'amas mycéliens, puis, à partir de macrohyphes (filaments de fort diamètre ou juxtapostion de plusieurs), des microhyphes se développent et pénètrent dans les tissus. Le processus infectieux intéresse le cortex, l'endoderme, le xylème, le liber et le parenchyme médullaire. Le mycélium se propage dans les vaisseaux du bois qu'il obstrue fréquemment au niveau racinaire et jusqu'au plateau de tallage. Cette dernière zone est peu favorable à son développement. En cas d'attaque grave, il y a passage aux racines secondaires et envahissement de la base des tiges avec formation de périthèces (FELLOWS, 1928). Cette infection perturbe la translocation qui est inhibée lorsque le champignon envahit le phloème (CLARKSON et al., 1975).

1.2. LA MALADIE, SON EVOLUTION ET LES METHODES DE LUTTE

Les symptômes apparaissent aux différents stades de développement de la plante. En cas d'attaque précoce, les racines présentent des nécroses et peuvent pourrir ; les plantules sont alors tuées en foyers. Quand les plantes sont plus âgées, elles demeurent chétives et leur tallage est réduit. Les limbes foliaires se dessèchent, s'enroulent et deviennent très clairs. A maturité, les inflorescences sont blanchâtres (symptôme des "épis blancs") et si l'attaque est très grave, les épis ne se forment par (WHITE, 1947). Lorsque l'hygrométrie est élevée, les épis sont envahis par *Cladosporium herbarum* (Pers.) Lk.. Les grains présentent un échaudage. Les racines des plantes malades sont entourées d'un manchon mycélien dense.

Les pertes sont très variables selon le moment des attaques, leur extension et la taille des foyers. Elles peuvent atteindre 60 à 80 p. 100 dans des cas extrêmes avec destruction des racines coronaires.

Différents facteurs favorisent l'extension de la maladie au champ : des températures de 12 à 20°C, le relèvement du pH du sol, sa bonne aération, une forte humidité printanière ou des apports d'azote au tallage, par exemple (GARRETT, 1948 ; PONCHET et COPPENET, 1962).

La dissémination naturelle de la maladie est lente : 0,1 m par an, en moyenne (PREW, 1980a), mais les façons culturales accroissent considérablement cette extension : de 0,9 à 2,5 m par exemple, lors d'un essai réalisé sur un premier Blé (PREW, 1980b).

La présence de *G. graminis* prédispose le Blé aux attaques de *Septoria nodorum* Berk. : les lésions foliaires sont plus grandes et plus nombreuses et la fructification du champignon est accrue (JENKINS et GARETH JONES, 1980).

Le Piétin-échaudage est caractérisé par une évolution particulière au cours des années. Le phénomène connu sous le nom de déclin a été observé et étudié par différents auteurs, notamment LEMAIRE et COPPENET (1968), SLOPE et COX (1964), GARRETT (1970). Une revue de la question due à WALKER (1975), a été actualisée par WONG (1981).

DÉGÂTS DE PIÉTIN-ÉCHAUDAGE SUR BLÉ

0 PLANTE SAINE

1 PLANTE ATTAQUÉE TRÈS TARDIVEMENT, MAIS PRÉSENTANT DES SYMPTÔMES D'ÉCHAUDAGE

2 PLANTE AYANT TALLÉ, MAIS DONT LES TALLES ONT AVORTÉ

3 PLANTE N'AYANT PAS TALLÉ ET PRODUIT UN SEUL ÉPI

4 PLANTE ATTAQUÉE TRÈS PRÉCOCEMENT, N'AYANT NI TALLÉ, NI ÉPIÉ.

En cas de culture continue de céréales, on note d'abord une augmentation des attaques jusqu'à un stade très grave qui se situe entre la seconde et la quatrième année de culture continue. Puis, la maladie diminue d'intensité pour se situer en deçà d'un seuil de nuisibilité. L'interruption de la monoculture entraîne une rupture de cette évolution qui s'exprime de façon variable en intensité et durée selon la plante utilisée.

Différentes hypothèses, présentant peut-être certaines complémentarités, sont avancées pour expliquer le phénomène :

- apparition d'une microflore antagoniste sous l'effet de la répétition de la culture : selon LEMAIRE et COPPENET (1968), la réduction des attaques provient du développement d'une microflore compétitive ou antagoniste de *G. graminis*. L'incidence des cultures de coupure est expliquée par la réduction du nombre de germes amylolytiques et protéolytiques qui se traduira par une "explosion" de la maladie au cas de nouvelle répétition de la culture céréalière,

- intervention de facteurs nutritionnels : BROWNS et al. (1973) mentionnent des changements nutritionnels de la rhizosphère provoqués par des interactions entre l'agent du Piétin-échaudage et la microflore du sol. POPE et JACKSON (1973) signalent la modification des exsudats racinaires par des bactéries et en déduisent que le déclin varie parallèlement à leur attractivité.

- modification des souches : l'étude des isolats de *G. graminis* présents dans un sol portant une culture continue de blé, permet d'observer que leurs caractères ne sont pas les mêmes aux différents moments de l'évolution de la maladie.

En phase d'accroissement, les souches ont un pouvoir pathogène élevé, colonisent la base des gaines foliaires et produisent abondamment des périthèces. En phase de déclin, par contre, elles ne provoquent que très peu de dégâts et ne fructifient pas (LEMAIRE et al., 1970 ; LAPIERRE et al., 1970). Pour CHAMBERS et FLENTJE (1967) et TIVOLI (1976), cet état d'hypoagressivité, observé également après plusieurs cultures sur milieu artificiel, est stable.

Cette hypothèse a été confortée en 1970 par les équipes de LAPIERRE et LEMAIRE qui ont mis en évidence des particules de type viral dans des souches hypoagressives et montré que les souches agressives en étaient dépourvues.

Les travaux effectués sur les relations entre champignon et virus, ainsi que ceux réalisés dans le cadre de ce mémoire, seront développés plus loin.

Pour d'autres auteurs, la modification des souches aurait une origine génétique. WHITE et MAC INTYRE (1943) obtiennent, à partir du même asque, des ascospores donnant des souches agressives et d'autres,des souches hypoagressives. CHAMBERS et FLENTJE (1967) indiquent que la plante sélectionne chez le champignon l'allélomorphe virulent, les souches provenant d'ascospores issues de périthèces développés sur racines vivantes étant agressives au contraire de celles ayant pour origine des périthèces développés en saprophyte.

Au plan des méthodes de lutte, les caractères de la maladie, la localisation du champignon et le coût des traitements éventuels rendent non utilisables pratiquement les produits chimiques. Par ailleurs, la résistance génétique n'aura de perspectives qu'à long terme et encore, pour l'instant, de façon indirecte, en utilisant la résistance induite aux isolats naturels agressifs,due aux isolats hypoagressifs. Un tel programme, initié en 1973, vise à créer des cultivars bien adoptés à la prémunition (cf. *infra*). Cette aptitude varie en effet grandement (LEMAIRE *et al*., 1982).

Il faut donc recourir à d'autres méthodes : culturales et biologiques.

Parmi les méthodes culturales, le choix des rotations occupe une place importante. LEMAIRE et COPPENET (1968) classent les précédents culturaux selon leur influence ultérieure sur la maladie : certains, comme la Betterave, favorisent le Piétin-échaudage, d'autres éliminent l'inoculum (crucifères et légumineuses), mais les attaques sur céréales sont importantes deux années après. Enfin, les graminées ont peu d'influence sur la réduction de l'inoculum et les risques d'attaques graves sont élevés l'année suivante. De ce point de vue, il est préférable de ne pas rompre une succession de céréales.

.../...

La fertilisation azotée accroît la sensibilité racinaire, mais stimule le développement des racines coronaires (GARRETT, 1948).

Certaines techniques de semis conduisant à un plus grand écartement entre les plantes réduisent les attaques (LEMAIRE et al.,1969) ; elles sont peu compatibles avec la phytotechnie actuelle.

Les procédés de lutte biologique offrent de sérieuses perspectives en relation avec l'accroissement des connaissances sur les causes du déclin :

- par modification des biocénoses du sol. LEMAIRE et JOUAN (1973) incorporent au sol des substrats nutritifs (farine de soja, gélatine,...) qui favorisent dans leur voisinage des microorganismes antagonistes de *G. graminis*. Cette méthode présente une durée d'action faible et son coût est prohibitif,

- par stimulation des phénomènes de compétition. BALIS (1970) et SCOTT (1970) montrent que l'incidence du Piétin-échaudage est limitée lorsque des champignons appartenant au genre *Phialophora* colonisent les racines de céréales. Ces champignons se développent sur les mêmes sites racinaires que *G. graminis*, mais sans provoquer de nécroses. WELLER et COOK (1983) signalent que des *Pseudomonas spp.* appliqués sur les semences de Blé protègent efficacement la céréale des attaques de Piétin-échaudage.

- par utilisation des souches hypoagressives. Cette méthode de lutte, mise au point à la Station de Pathologie végétale de Rennes, repose sur deux phénomènes biologiques : la prémunition du Blé et la contagion de l'hypoagressivité.

TIVOLI et al. (1974) montrent que l'inoculation d'une plante par une souche hypoagressive induit chez elle des réactions de défense qui la protègent d'une attaque ultérieure par une souche agressive. Le phénomène se produit *in vitro* et au champ. Il est confirmé par WONG (1975) qui constate que l'extension d'un foyer naturel est limitée après incorporation au sol d'une souche hypoagressive.

.../...

PLANTULES DE BLÉ APRES INFECTION PAR *G. GRAMINIS*

A DROITE, LA SOUCHE AGRESSIVE PROVOQUE LA MORT DES PLANTULES. LES RACINES SONT NÉCROSÉES ET LA BASE DES GAINES FOLIAIRES EST COLONISÉE.

A GAUCHE, LA SOUCHE HYPOAGRESSIVE ENTRAÎNE DES DÉGÂTS PEU IMPORTANTS.

Cette opération permet peut-être la transmission ou la contagion d'un (de) facteur(s) d'hypoagressivité aux souches sauvages du sol. Les dégâts dus à la maladie pendant la phase de crise peuvent ainsi être réduits (LEMAIRE et JOUAN, 1973). Des échanges entre les deux types de souches sont mis en évidence *in vitro* par TIVOLI et al. (1979) qui montrent l'existence d'une relation entre ces échanges et la réduction de l'agressivité.

La technique de lutte découlant de ces travaux consiste à enrober les semences avec une souche hypoagressive. Les résultats obtenus sur plusieurs années sont prometteurs, notamment chez certaines variétés (Joss, Roazon,...). Le traitement ne semble pas agir seulement envers *G. graminis*, mais aussi sur d'autres facteurs de rendement (LEMAIRE et al., 1982). WONG et SOUTHWELL (1980) et WONG (1981), étudiant la protection conférée par différents champignons, indiquent une efficacité marquée de la variété *graminis* et de *Phialophora radicicola* var. *radicicola*, au moins en cas d'attaques peu sévères et soulignent l'intérêt de tels apports en début de culture continue. Par contre, *Phialophora radicicola* var. *graminicola* n'exerce aucune protection.

Dans ce contexte, il apparaît donc particulièrement intéressant de rechercher la ou (les) cause(s) des modifications du pouvoir pathogène du champignon ; l'hypothèse d'une origine virale a fait l'objet des travaux présentés dans ce mémoire.

1.3. LES PARTICULES DE TYPE VIRAL ASSOCIEES A *GAEUMANNOMYCES GRAMINIS*

Depuis leur mise en évidence en 1970 par LAPIERRE et al. et LEMAIRE et al., les virus de *G. graminis* ont fait l'objet de travaux de plusieurs auteurs dont les résultats peuvent être regroupés en quatre secteurs :

- recherche des PTV (éventuellement des ARN bicaténaires - ARNbc) en relation avec certains caractères du champignon,
- caractérisation des particules virales et étude de leur variabilité,
- transmission des virus à des isolats sains et essais de "guérison" d'isolats porteurs,
- étude d'inhibiteurs et de toxines en relation avec les PTV et les ARNbc.

Recherche des virus et caractères du champignon :

Parmi sept souches dont le contenu viral est analysé par LAPIERRE et LEMAIRE, deux se révèlent virosées. Il s'agit de souches isolées après plusieurs cultures de blé : leur pouvoir pathogène est faible et leur fructification sexuée à peu près nulle.

Trois souches étudiées sont des isolats ascosporés d'une souche d'origine mycélienne reconnue virosée, mais elles sont dépourvues de particules virales.

RAWLINSON et al. (1973) réalisent en Angleterre une recherche du même type chez 156 isolats des variétés *tritici* et *avenae* prélevés dans des parcelles portant des céréales soit pour la première fois (11 cas), soit en culture continue entre la seconde et la douzième année (145 isolats). Ils rencontrent des particules de deux tailles : 27 et 35 nm. Parmi les onze isolats de première année, deux contiennent les éléments de 27 nm et aucun les grosses particules. Par contre, plus de la moitié des isolements effectués en monoculture renferment les deux types de PTV.

Ces auteurs constatent que les isolats contenant seulement les particules de 27 nm sont beaucoup plus pathogènes que ceux dépourvus de virus. Une observation contraire est faite pour les isolats renfermant les deux éléments. En culture continue, la proportion de ces derniers isolats croît progressivement les neuf premières années, puis diminue.

Aucune acquisition ou perte de particules n'est observée durant l'infection de l'hôte par le champignon et l'analyse du contenu viral de cinquante-six cultures ascosporées provenant de quatre isolats porteurs montre que les virus ne sont pas transmis lors de la reproduction sexuée.

RAWLINSON et MUTHYALU (1976) introduisent "naturellement" (c'est-à-dire par voie ascosporée) *G. graminis* var. *tritici* dans une parcelle n'ayant pas porté de céréales depuis 100 ans. Pendant les trois premières années de culture continue d'un blé de printemps, les isolats collectés sont tous dépourvues de PTV. Ces auteurs jugent le phénomène normal dans la mesure de l'origine ascosporée du champignon, dépourvue de virus selon eux et bien que ce résultat soit en contradiction avec celui de précédents essais (RAWLINSON et al., 1973). La quatrième année et trois mois après l'implantation d'un blé d'hiver, 17 isolats sur 38 examinés sont virosés (particules de 27 nm seulement). Neuf mois plus tard, les PTV de 35 nm sont également présentes. Dans les deux cas, une forte proportion de capsides vides est notée.

Une explication est fournie qui réside dans le transport par le champignon de "provirus" endogènes induisant la synthèse virale sous certaines conditions (par exemple la fusion de cellules "permissives" et "non permissives"). L'importance des capsides vides dépendrait de l'efficience des ARN messagers impliqués.

Ces mêmes auteurs (1975 et 1976) mettent en évidence des PTV de trois tailles (27, 35 et 40 nm) chez des isolats de la variété *graminis* et montrent l'existence de relations sérologiques d'une part entre des extraits de la variété *tritici* provenant de tous les continents, d'autre part avec le contenu de certains isolats des variétés *avenae* et *graminis*.

.../...

Au laboratoire de Cryptogamie de l'Université d'Orsay, PARISOT (communication personnelle) met en évidence des ARN bicaténaires à partir de souches virosées, mais également de souches réputées sans virus et dont l'analyse ultérieure a montré qu'elles étaient en fait "devenues" virosées lors de leur conservation en mycothèque.

Cette recherche d'ARN bicaténaires, conduite par ALMOND <u>et al</u>. (1977) chez une vingtaine de souches, révèle l'existence de douze composants dont les poids moléculaires varient de 1 à 3 x 10^6 daltons. Le contenu de toutes ces souches est différent. DAY et DODDS (1979) en déduisent que la population de *G. graminis* présente à un instant donné au voisinage des racines, renferme des ARN bicaténaires dans un certain équilibre. Ils en concluent que la manipualtion d'un tel système en vue d'une lutte biologique s'avèrera difficile.

L'examen par FRICK et LISTER (1978) de trente-deux isolats américains montre que trente contiennent des ARN bicaténaires et dix-neuf parmi eux des virus. Ils notent l'absence de relations avec le pouvoir pathogène et d'autres caractères biologiques du champignon.

Enfin, JADOT (1979) caractérise quatre niveaux d'agressivité et trouve un ou deux types de particules dans quelques isolats montrant une faible activité vis-à-vis de l'hôte.

<u>Caractérisation des particules virales et étude de leur variabilité</u> :

LAPIERRE et LEMAIRE (loc. cit.) ne trouvent qu'une seule taille de particules (29 nm) dont la constante de sédimentation est de 116 S et le poids voisin de 5,5 millions. La production de virus mesurée après purification est très faible : 5 à 10 µg pour 100 g de mycélium essoré.

Des éléments de 27 et 35 nm sont trouvés par RAWLINSON <u>et al.</u> (1973) avec des constantes de sédimentation respectives de 100 et 148 S. En chlorure de césium, les petites particules sont séparées en trois composants et les grosses en deux ; par électrophorèse en gel de polyacrylamide de préparations de deux types, une protéine majeure de 70 000 daltons est détectée.

.../...

Plus tard, RAWLINSON et MUTHYALU (1975) indiquent la présence d'un troisième virus de 40 nm.

Les particules isolées par FRICK et LISTER (1978) se répartissent en quatre classes de tailles : 35, 39, 41 et 42 nm. Par électrophorèse de l'ensemble, ils distinguent deux protéines majeures de 70 000 daltons ainsi que trois ARN bc principaux. Après avoir préparé trois antisera à partir de trois isolats, ces auteurs montrent qu'il existe des groupes d'isolats du point de vue sérologique, indiquent l'existence de relations entre eux et proposent une liaison entre le pouvoir pathogène, les sérotypes et les particules virales.

Une analyse approfondie des ARN bc et des composants polypeptidiques capsidiaux provenant de préparations de PTV obtenues à partir de douze isolats virosés (particules de 35 ou 40 nm ou bien de 35 et 40 nm) de la variété *tritici*, est menée par ALMOND et al. (loc.cit.), ALMOND (1978) et, surtout, BUCK et al. (1981) et RAWLINSON et al. (1981). Le nombre de composants ARN bc varie largement (de un à dix) pour un même isolat et leur distribution est originale pour chacun. Toutefois on rencontre, dans les différents isolats, des ARN bc de même poids moléculaire (de 1,05 à 6,3 x 10^6 daltons). Le nombre de polypeptides capsidiaux varie de un à neuf pour un même isolat (et le poids moléculaire de 55 à 125 x 10^3 daltons) et leur distribution est également originale. Notons que les isolats étudiés présentaient peu de relations sérologiques.

RAWLINSON et BUCK (loc.cit.) et ROMANOS et al. (1981) recherchent la présence d'ARN bc satellites chez deux isolats reliés sérologiquement, ayant deux composants ARN bc et dont les poids moléculaires des polypeptides capsidiaux sont similaires : un isolat (référence 38-4 A) contient un ARN bc surnuméraire satellite et ces auteurs émettent l'hypothèse qu'il coderait par la synthèse d'un polypeptide produit *in vivo* par le champignon.

Transmission des PTV et "guérison" d'isolats porteurs :

RAWLINSON et al. (1973) obtiennent la transmission des PTV à des isolats qui en sont dépourvus, par anastomoses mycéliennes entre des origines du champignon, mais sans changements notables. Un tel travail n'est pas facilité par les incompatibilités fréquentes et la formation difficile d'hétérocaryons chez *G. graminis* var. *tritici*.

.../...

En tout cas (RAWLINSON et MUTHYALU, 1975 et 1976), l'existence d'isolats provenant de régions très variées et renfermant des PTV reliées sérologiquement indique une longue relation entre champignon et virus.

Des essais de transmission des virus purifiés à des végétaux supérieurs (Haricot, Tabac,...) s'avèrent négatifs, de même que des tentatives de transmission par des nématodes mycophages (RAWLINSON et MUTHYALU, 1975).

Plusieurs auteurs (LAPIERRE et al., 1970 ; RAWLINSON et al., 1973) ont observé que les virus n'étaient pas présents dans les ascospores. En revanche TIVOLI et al. (1979) et FERAULT (1981) notent que les isolats monoascosporés sont le plus souvent virosés et que cet état est compatible avec une agressivité élevée.

La transmission directe de PTV extracellulaires n'est pas rapportée. Des tentatives de transmission utilisant des protoplastes (RAWLINSON et MUTHYALU, 1974) n'ont pas abouti en raison de difficultés de régénération.

Enfin, RAWLINSON et al. (1973) observent que des cultures issues d'extrémités d'hyphes produites par le champignon cultivé à 30°C pendant vingt-quatre heures, ne contiennent plus de virus.

Etude d'inhibiteurs et de toxines en relation avec les PTV et les ARN bc :

Différents auteurs, dont CHAMBERS et FLENTJE (1967a), ont observé des inhibitions de croissance d'isolats de *G. graminis* var. *tritici* par d'autres.

Par ananogie avec les systèmes "killer" trouvés chez *Saccharomyces cerevisiae* et *Ustilago maydis*, RAWLINSON et BUCK (1976, non publié) émettent l'hypothèse d'une production de toxine(s) polypeptidique(s) dépendante des PTV (à ARN bc) et de la présence d'ARN bc satellite(s). Il n'y aurait alors effet des PTV sur le pouvoir pathogène du champignon que chez les isolats sensibles à la (aux) toxine(s) et où l'(les) ARN bc satellite(s) serait (ent) présent(s).

.../...

ROMANOS et al. (1980) notent la production d'inhibiteur(s) de croissance diffusible(s) par trois isolats de la variété *tritici*, , parmi 22 éprouvés, et dont l'(les) effet(s) est (sont) marqué(s) sur toutes les origines testées mais également sur des champignons appartenant à d'autres genres et espèces. La (les) quantité(s) d'inhibiteurs varie(nt) selon l'isolat "producteur" et les conditions de milieu.

La présence de cet (ces) inhibiteur(s), dont la (les) nature(s) n'est (ne sont) pas connue(s), est sans relation avec les PTV et les ARN bc contenus dans les isolats correspondants. Leur(s) rôle(s) dans le phénomène de déclin de la maladie est (sont) hypothétique(s).

OBJET ET PROGRAMME DE TRAVAIL

Les résultats fournis par les équipes française , anglaise et américaine depuis la découverte de PTV associées à *G. graminis* en 1970, étant contradictoires, les laboratoires de Pathologie végétale de l'INRA à Rennes et Versailles ont décidé, en 1977, de concentrer leurs efforts sur ce sujet qui paraissait, alors, encore prometteur de perspectives dans le domaine des relations entre pouvoir pathogène et présence de virus.

Notre étude s'est située dans le cadre de la confrontation des caractères de souches du champignon et de leur contenu viral, ces deux aspects étant replacés dans leur dynamique. Il s'agit, à proprement parler, d'un travail de mycovirologie qui vise à approfondir les connaissances dans le domaine du déterminisme de la modification des souches et à évaluer la "responsabilité" des particules de type viral dans les variations de pouvoir pathogène du champignon.

Cette thèse apporte des réponses aux questions suivantes :

- Existe-t-il des relations, à un moment donné de leur évolution, entre certains caractères biologiques des isolats du champignon et leur contenu viral ?

- Ces caractères et le contenu viral évoluent-ils lors de la conservation *in vitro* du champignon ?

- Quel est le devenir des particules virales au moment de la fructification sexuée de *G. graminis* ?

- Les conditions de milieu ont-elles une influence sur les rapports champignon-virus ?

.../...

- Afin de mieux analyser les effets des virus sur la biologie de l'hôte, peut-on transmettre directement les PTV à une souche qui en est dépourvue et "guérir" une souche virosée ?

- Existe-t-il des PTV chez *Phialophora radicicola* CAIN, forme végétative de *G. graminis* pour certains auteurs, et quelles relations y-a-t-il entre les virus associés à ces deux champignons ? Peut-on réaliser des transmissions réciproques de virus hétérologues ?

----

2 - MATERIEL ET METHODES

On ne développera, dans ce chapitre, que les techniques communément utilisées. Les méthodes particulières seront indiquées dans les paragraphes correspondants de la partie "Résultats".

2.1. LE CHAMPIGNON

2.1.1. Les souches : origine, isolement, milieux de culture

Les souches utilisées présentent des caractères biologiques variés et sont de provenances géographiques diverses. La plupart ont servi ou sont encore utilisées à des études de mycologie menées à la Station de Pathologie Végétale de Rennes et au Laboratoire de Cryptogamie de l'Université d'Orsay.

La référence employée pour les désigner comporte plusieurs chiffres :

- le premier correspond à l'année d'isolement,
- le second mentionne le département où le prélèvement a été effectué (numéro de référence ou minéralogique),
- le troisième indique la plante-hôte chez laquelle le champignon a été isolé (depuis 1977, ce chiffre est le numéro de l'isolement),
- un quatrième, éventuellement, précise que la souche est :
  . soit un isolement monoascosporé de ce qui précède,
  . soit issue d'un secteur obtenu en boîte de Petri.

Ces souches ont des origines biologiques de deux types : elles proviennent de la phase mycélienne intraracinaire ou d'isolements ascosporés.

Dans le premier cas, le champignon est isolé de racines de plantes présentant les symptômes de la maladie. Des fragments sont prélevés au niveau des nécroses, désinfectés par une solution alcoolique de bichlorure de mercure (2 p. 1000) pendant quinze secondes à une minute, rincés plusieurs fois à l'eau stérile, puis déposés en boîte de Petri sur un milieu gélosé contenant de l'extrait de malt à 2 p. 100. La conservation est faite en tube contenant le même milieu, à la température du laboratoire et à l'obscurité (deux repiquages par an, en général). Dans certains cas, le maintien des souches peut avoir lieu à + 4°C sur grains d'orge desséchés.

Les isolements monoascosporés sont effectués par étalement d'ascospores sur milieu gélosé. Les spores germées sont transférées en boîte de Petri contenant du malt (2 p. 100) gélosé et le champignon est ensuite cultivé de façon analogue.

Les souches suivantes ont été utilisées dans notre étude :

⁝ origine mycélienne intraracinaire :

- isolées dans une culture continue de Blé, pratiquée depuis 1965 à la Station Agronomique de Quimper (dite "série de Quimper") :
  612, 911, 011, 111, 211, 311, 411, 511, 611, 711.

- isolées dans d'autres régions :
  6-15-1, 6-7-1, 6-17-1, 77-11S, 78-14, 79-17-1, 79-35-1, 79-35-3.

⁝ origine ascosporée :

911-1 (origines Rennes et Orsay), 911-2, 911-3, 911-1-1 à 911-1-8

911-1-10, 11, 12, 20, 21, 22, 23, 24, 25

78-14-C14

79-17-1-1 à 79-17-1-8.

.../...

Celles ayant servi de référence pour les caractères de croissance et d'agressivité ainsi que pour le contenu en virus et l'analyse sérologique sont les souches 612, 911 et 911-1, conservées par la Station INRA de Rennes.

En vue de la recherche de particules de type viral, le champignon est mis en culture en fioles de Roux dans un milieu contenant du malt à 2 p. 100 et, le plus souvent, de la L-asparagine à 2 p. 1000. Les fioles sont placées dans une enceinte à + 23°C et à l'obscurité.

Dans ces conditions, il s'écoule au minimum un mois et demi entre les opérations d'isolement et de recherche de virus.

2.1.2. *Caractères de croissance, agressivité et fructification sexuée*

La croissance du champignon est mesurée après ensemencement en boîte de Petri par un explantat de la souche à tester (milieu gélosé - malt 2 p. 100, à + 23°C et à l'obscurité). On évalue périodiquement pendant neuf ou dix jours le rayon moyen des colonies. L'opération comporte au minimum trois répétitions.

Le test d'agressivité des souches repose sur leur inoculation au blé à un stade précoce. Le repiquage des plantules dans des tubes à essais contenant de la perlite humidifiée permet l'observation directe des nécroses et le dénombrement des périthèces en formation sur les racines. La bonne fiabilité de la méthode nécessite l'utilisation précise des manipulations mentionnées ci-dessous. Dans le but d'obtenir un matériel sain et homogène, les caryopses de blé (variété Roazon) préalablement désinfectés à l'aide d'une solution alcoolique à 2 p. 1000 de bichlorure de mercure, sont mis à germer sur milieu gélosé à base d'extrait de malt (à 2 p. 100). Lorsque la radicule apparaît, les semences axéniques sont déposées au front de croissance d'une colonie de *Gaeumannomyces graminis*, sur le même milieu. Après trois jours d'incubation, temps nécessaire pour obtenir une infection suffisante du blé, à + 20°C pendant huit heures d'éclairement et à + 15°C pendant seize heures d'obscurité, les plantules sont transplantées dans des tubes (22 cm de long x 22 mm de diamètre) remplis de perlite humidifiée

(deux plantules par tube et trois tubes par souche). Les plantules ainsi repiquées sont placées à nouveau dans les conditions précédentes.

L'agressivité est évaluée deux semaines après le repiquage, par la longueur de racine nécrosée des plantules et par l'existence, ou non, d'un développement mycélien à la base des gaines foliaires.

Deux semaines plus tard, on dénombre les périthèces éventuellement formés le long des racines.

Les résultats sont exprimés de la façon suivante :

- nécroses racinaires : par le nombre de millimètres de racines nécrosées,

- attaques de tiges : par leur nombre sur six plantules,

- fructification sexuée : par le nombre de périthèces formés sur les six plantules.

En fonction de ces notations, deux niveaux d'agressivité peuvent être définis (FERAULT et al., 1979) :

- une forte agressivité (A) se traduisant par des nécroses racinaires importantes et une colonisation de la base des gaines foliaires par le mycélium. Ces symptômes sont généralement accompagnés d'une abondante production de périthèces (type A_1). Chez certaines souches cependant, la reproduction sexuée est très faible ou nulle (type A_2) ;

- une hypoagressivité typique (a) : le champignon provoque de légères lésions racinaires sans pouvoir coloniser la base des gaines foliaires ; il est incapable de produire des périthèces (Tableau 1).

TABLEAU 1 : Caractérisation des niveaux d'agressivité de *Gaeumannomyces graminis*

Niveau d'agressivité.	Nécrose racinaire (++ supérieure à 80 p.100) (+ inférieure à 20 p.100)	Colonisation de la base des gaines foliaires	Reproduction sexuée (X)
Souches agressives (A)			
. Type A1	++	+	+
. Type A2	++	+	ε
Souches hypoagressives (a)	+	0	0

(X) pour les six plantules : + production de plus de dix périthèces

ε aucune production ou, parfois, d'un seul périthèce.

2.2. LES PARTICULES DE TYPE VIRAL (PTV)

2.2.1. *Méthodes de purification et de concentration*

Différentes méthodes de purification des PTV à partir du mycélium du champignon ont été proposées. LAPIERRE et al. (1979) réalisent l'extraction dans un tampon phosphate de faible molarité (0,01 M), puis traitent l'extrait obtenu après ultracentrifugation par le mélange de polyalcools indiqué par KITANO et al. (1961) : le rendement est faible (5 à 10 µg de virus pour 100 g de mycélium) et un seul type de particules est mis en évidence (29 $\pm$ 2 nm). RAWLINSON et al. (1973) utilisent les ultrasons pour dissocier les éléments avant de traiter au tétrachlorure de carbone, puis au chloroforme. JADOT (1979) fait appel à la même méthode. FRICK et LISTER (1978) enfin, ont comparé différents schémas comprenant l'addition à l'extrait de tétrachlorure de carbone, de butanol, de chloroforme et du mélange butanol-chloroforme et adopté cette dernière voie. Les méthodes employées par ces trois équipes permettent d'observer les deux types de particules (27 et 35 nm selon RAWLINSON).

De notre côté, il s'agissait de mettre au point une méthode normalisée permettant de répondre à deux objectifs :

- mise en évidence des deux particules.

- évaluation, avec une bonne fiabilité, des quantités présentes et détection de faibles concentrations virales.

Dans cette optique, nous avons éprouvé, avec la souche 911, certaines méthodes déjà citées dans le cas des PTV de *G. graminis* ou utilisées dans la recherche d'autres mycovirus, en les adaptant à nos conditions de manipulation et à ce matériel fongique :

- ultracentrifugations différentielles seules,
- butanol,
- chloroforme,
- butoxy et éthoxyéthanol,

avec des variations de molarité du tampon d'extraction (0,01 M ou 0,1 M phosphate monopotassique - disodique).

Ces méthodes sont indiquées par la figure 1.

Les résultats obtenus (moyenne de deux répétitions) sont rapportés dans le tableau 2.

Mycélium essoré et pesé

Broyage dans l'azote liquide

Homogénéisation au mixer pendant 2 min dans 5 à 6 volumes de
tampon phosphate monopotassique-disodique 0,1 M ou 0,01 M, pH 7,2
2-mercaptoéthanol 0,4 p. 100

entrifugation 1
4000 g 15 min
Culot éliminé
entrifugation 2
10 000 g 5 min
Culot éliminé
entrifugation 3
18 500 g 10 min
Culot éliminé

Addition de n-butanol
(8,5 p. 100 en volume)
Agitation 20 min à 4°C
Centrifugation 1
4000 g 5 min
Culot éliminé
Centrifugation 2
18 500 g 10 min
Culot éliminé

Centrifugation 1
4000 g 15 min
Culot éliminé
Addition de Chloroforme
volume à volume
Agitation 5 min
à + 4°C
Centrifugation 2
5000 g 10 min
Phase aqueuse
conservée
Centrifugation 3
18 500 g 10 min

Addition de :
1 volume de
tampon phosphate
mono et dipo-
tassique
2,5 M pH 7,6
et
0,8 volume
butoxyéthanol (1)
et
éthoxyéthanol (2)
Agitation 20 min
à 4°C
Centrifugation 1
4000 g 5 min
Phases supérieure
et inférieure
éliminées
Homogénéisation
de l'interphase
dans 0,3 volume
de tampon phos-
phate monopotas-
sique-disodique
0,1 M pH 7,2
Centrifugation 2
4000 g 5 min
Culot éliminé
Centrifugation 3
18 500 g 10 min
Culot éliminé

.../...

Ultracentrifugation 1. Rotor 60 (Spinco modèle L)
45000 tr/min - 90 min.

Reprise des culots dans du tampon phosphate monopotassique-disodique 0,01 M pH 7,2 2-mercaptoéthanol 0,4 p. 100

Homogénéisation au "Potter" et clarification 5000 g - 5 min

Ultracentrifugation 2. Rotor 75 - 55000 tr/min - 60 min
ou Rotor 50 - 50000 tr/min - 75 min

Reprise des culots dans du tampon phosphate monopotassique-disodique 0,01 M pH 7,2

Homogénéisation au "Potter" et clarification 5000 g - 5 min

<u>Extrait purifié à analyser</u>

FIGURE 1 : METHODES DE PURIFICATION DES PTV CONTENUES DANS LA SOUCHE 911

Tampons d'extraction \ Méthodes de Purification	Ultracentrifugations	Butanol	Chloroforme	Butoxy-éthoxy-éthanol
0,01M Phosphate	39	88	32	8
0, 1M Phosphate	31	100	44	6

TABLEAU 2 : Contenus viraux totaux obtenus après purification des PTV de la souche 911, selon différentes méthodes.

(Les résultats sont exprimés en indices - 100 = 0,1 M phosphate - butanol 8,5 p. 100 - comme indiqué au paragraphe 2.2.4.)

On constate des écarts importants dans les quantités de virus obtenues après purification et concentration, selon la méthode utilisée. Par contre, la molarité du tampon d'extraction semble peu importer. Toutefois, à côté de ces résultats globaux, deux observations qualitatives doivent être faites : l'extraction dans le tampon 0,01 M libère davantage de contaminants et la méthode au butoxy-éthoxyéthanol ne permet la mise en évidence que des particules de plus faible diamètre.

Dans ces conditions, la méthode 0,1M - butanol, qui s'avère d'autre part être très reproductible, a été retenue. Elle est appliquée dans les conditions suivantes : le champignon est cultivé trois semaines en fioles de Roux à une température de + 23°C et à l'obscurité. La production de mycélium essoré par récipient varie grandement avec la vitesse de croissance de la souche ; elle est au maximum de six à sept grammes.

Après essorage (*), le mycélium est réduit en poudre fine en présence d'azote liquide avant d'être homogénéisé pendant deux minutes dans un broyeur à hélice ("Waring-blendor") contenant cinq à six volumes

.../...

(*) On peut souligner la conservation plusieurs semaines, à + 4°C :

- du mycélium essoré
- des PTV contenues
- des PTV maintenues in vitro et de leurs capacités antigéniques.

de tampon phosphate monopotassique-disodique 0,1M à pH 7,2 et du mercaptoéthanol (0,4 p. 100). On ajoute à l'extrait obtenu 8,5 p. 100 en volume de n-butanol. Le mélange est agité durant vingt minutes à + 4°C, avant deux clarifications successives à 4000 g, quinze minutes et 18 500 g, dix minutes. Le surnageant est ultracentrifugé quatre-vingt dix minutes à 45 000 tours par minute dans un rotor 60 (Spinco, modèle L). Les culots, repris dans un faible volume de tampon phosphate monopotassique-disodique 0,01M à pH 7,2 contenant du mercaptoéthanol (0,4 p. 100), sont maintenus à + 4°C. Après agitation, ils sont homogénéisés au "Potter", clarifiés à 5000 g, cinq minutes, puis ultracentrifugés soixante minutes à 55 000 tours par minute (Rotor 75). On reprend les culots dans un tampon phosphate 0,01M à pH 7,2. Après homogénéisation, ils sont clarifiés à 5000 g.

La recherche des virus nécessite une quantité relativement faible de mycélium ; dix grammes par exemple. En dessous, cependant, la reproductibilité de l'opération est aléatoire.

Les extraits obtenus sont analysés en gradients discontinus de concentration de saccharose 10-20-30-40 p. 100 dans un tampon phosphate 0,01M à pH 7,2. Seize heures après préparation, l'ultracentrifugation a lieu dans un rotor SW50. 1 à 45 000 tours par minute durant quarante-cinq minutes (ou SW60 à 50 000 tr/min, trente-cinq minutes ; ou encore SW41 à 40 000 tr/min, soixante-dix minutes).

Le gradient est ensuite analysé à l'aide d'un appareil "ISCO". Les virus se répartissent en trois pics d'importance relative variable (figure 2). Les pics 1 et 2 correspondent respectivement aux particules icosaédriques de 26 et 35 nm de diamètre et le pic 0 à des particules pénétrées par l'acide phosphotungstique.

.../...

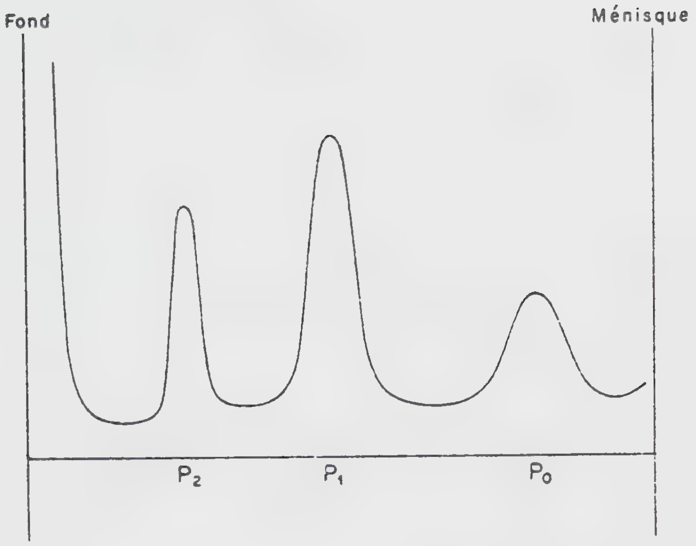


FIGURE 2 : Profil en gradient de concentration de saccharose, à 254 nm, d'un extrait purifié des virus de *G. graminis*.

La meilleure séparation des composants étant obtenue en utilisant le rotor SW41, toutes les manipulations à finalité quantitative sont effectuées dans ces conditions.

L'absorption en ultra-violet (de 220 à 290 nm) des extraits totaux ou du contenu des pics est mesurée à l'aide d'un spectrophotomètre "Beckman" le profil obtenu est représenté par la figure 3.

L'absorption présente un maximum en plateau entre 255 et 270 nm. Elle est encore élevée à 280 (rapport $\frac{260}{280}$ situé entre 1,15 et 1,2) et minimum autour de 250 nm.

.../...

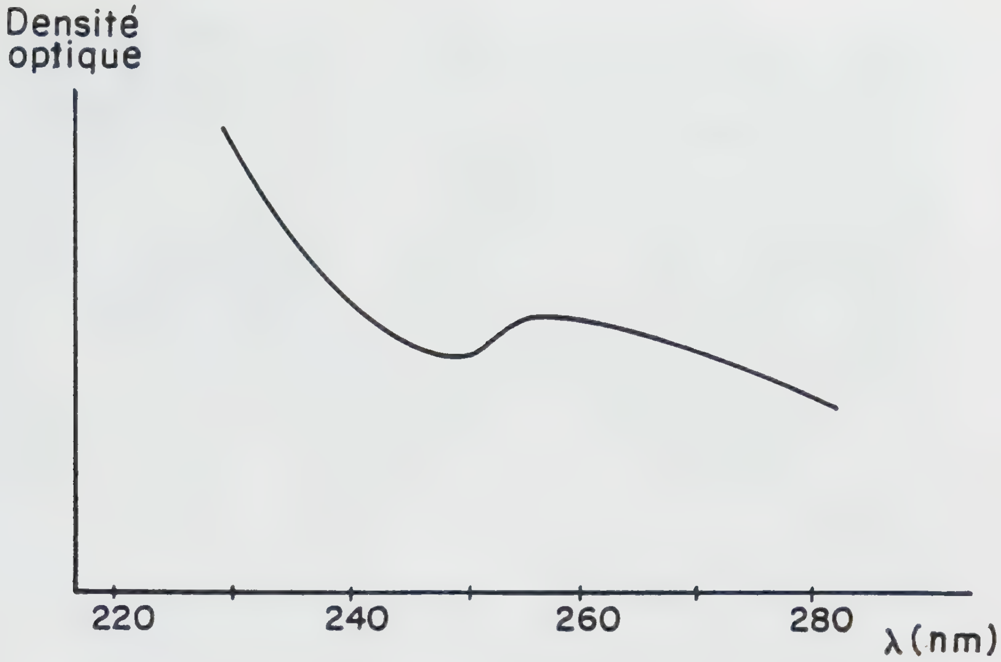


FIGURE 3 : Profil d'absorption en ultra-violet d'une solution purifiée des virus de *G. graminis*.

Les quantités de virus obtenues (deux particules) atteignent 200 à 300 µg pour 100 g de mycélium essoré [A 260 (0,1 p. 100) = 5].

2.2.2. *Microscopie électronique*

Les extraits purifiés sont examinés en microscopie électronique ("Philipps" EM 300) après coloration négative par l'acide phosphotungstique. On observe les particules complètes de 26 ± 1 et 35 ± 1 nm ainsi que les capsides vides de ces deux éléments.

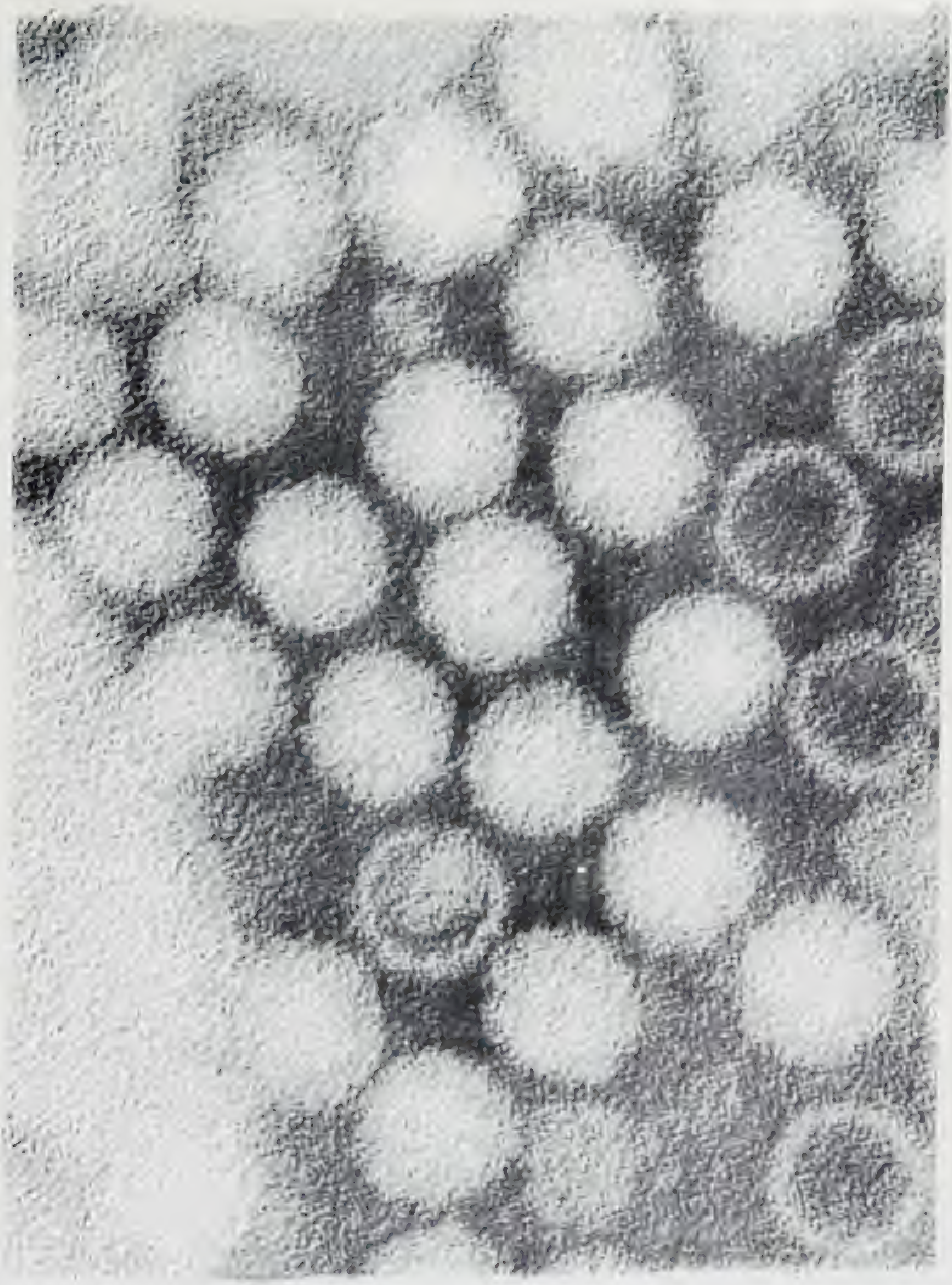
2.2.3. *Etude sérologique*

Des antisera sont préparés à partir des souches 911, 612 et 911-1. Pour cette dernière, l'immunisation de l'animal avait pour but de produire un sérum anti-protéines normales compte tenu de l'hypothèse de départ d'absence de PTV. Lorsque la présence des deux virus a été démontrée, la préparation de l'antisérum a été poursuivie à des fins de comparaison. Le même phénomène s'est produit à nouveau ultérieurement avec les souches 78-14 et 78-14-C1 4.

.../...

ASPECT, AU MICROSCOPE ELECTRONIQUE, D'UN EXTRAIT PURIFIE DE LA SOUCHE 911 DE *G. GRAMINIS*

PARTICULES DE 26 ± 1 ET 35 ± 1 NM. GRANDISSEMENT X 150 000 ENVIRON. MICROSCOPE "PHILIPS" EM 300 - 80 K.V.T.S. - COLORATION NÉGATIVE PAR L'ACIDE PHOSPHOTUNGSTIQUE.



EXTRAIT PURIFIE DE LA SOUCHE 911 DE *G. GRAMINIS*

PARTICULES DE 26 ± 1 NM, OBSERVEES APRÈS PASSAGE SUR GRADIENT DE SACCHAROSE.

GRANDISSEMENT x 1 000 000 ENVIRON.

Sept injections espacées de huit à dix jours sont pratiquées par voie intramusculaire, qui sont composées par moitié d'adjuvant incomplet de Freund. La dernière ne contient que la solution virale. La récolte du sérum intervient sept jours plus tard.

Les réactions sérologiques des extraits obtenus sont étudiées par immunodiffusion double en gélose (*) (OUTCHERLONY, 1958) : deux lignes anti-virus apparaissent qui correspondent à chacune des particules. Une précipitation anti-protéines normales se produit au voisinage du réservoir où sont déposés les anticorps (Figure 4).

Avec les extraits purifiés, la dilution limite anti-virus de ces sera est située entre 1/256e et 1/512e. La dilution d'emploi adoptée (absence de réaction anti-protéines normales) est 1/32e ou 1/64e.

Des comparaisons ont été effectuées avec le sérum anti-souche 511-2 précédemment obtenu par LAPIERRE et MOLIN (communication personnelle).

Dans tous les cas, les réactions sont identiques quels que soient les souches et les sera, y compris avec les différentes origines fongiques dont l'état virosé a été mis en évidence.

Contrairement à FRICK et LISTER (1978), aucun serotype distinct n'a été trouvé.

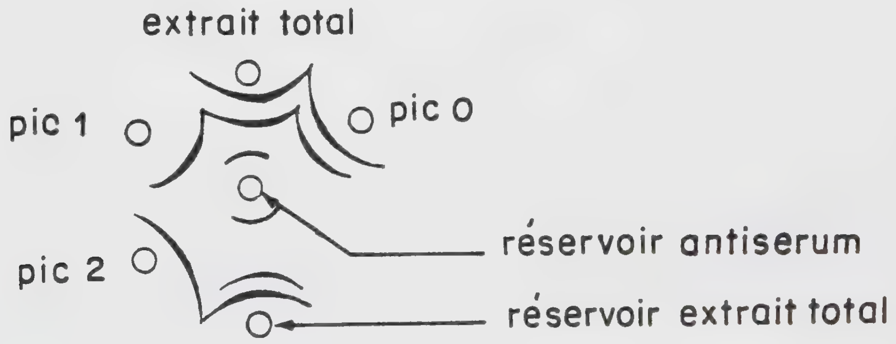


FIGURE 4 : Réactions sérologiques observées en immunodiffusion en milieu gélosé entre des extraits de la souche 911 de *G. graminis* et son antisérum.

(*) Gélose 1 p. 100, chlorure de sodium 0,85 p. 100, 0,01M phosphate monopotassique-disodique (en présence d'azide de sodium).

.../...

On utilise également la technique de microélectrophorèse en milieu gélifié (gélose ou agarose*) décrite par SPIRE (1967). En gélose, deux lignes anti-virus hétérologues apparaissent : l'une, longue, est située au voisinage du puits antigène, l'autre, plus courte, est immédiatement sous ce puits. Une ligne anti-protéines normales est observée en direction de l'anode. En agarose, la première ligne anti-virus est déplacée vers la cathode alors que la seconde se trouve au même endroit.

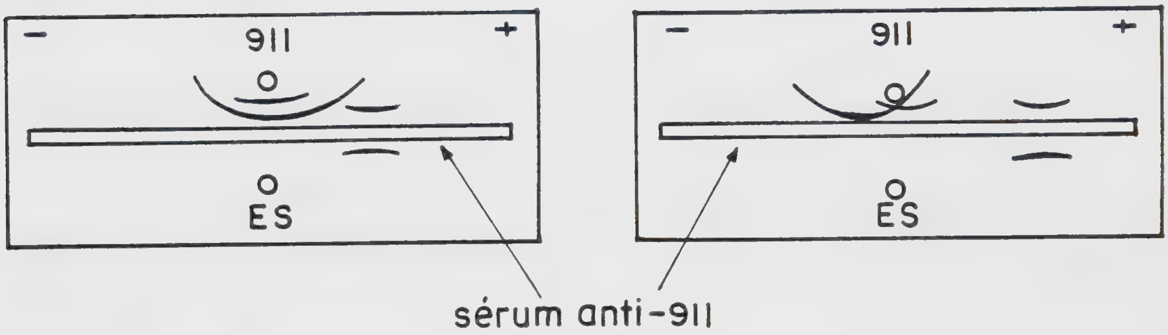


Figure 5 : Réactions sérologiques observées en immunoélectrophorèse en milieu gélifié (gélose à gauche, agarose à droite) entre des extraits de la souche 911 de *G. graminis* et son antisérum (ES : extrait de *G. graminis* sans PTV).

* Gélose 0,8 p. 100)
Agarose 0,8 p. 100) tampon Veronal - Veronal sodique 0,05 M pH 8,6

(en présence d'azide de sodium).
30 µA, 250 V, 75 minutes.

2.2.4. Expression des résultats

La présence et la quantité de PTV peuvent donc être respectivement recherchée et mesurée par les différentes techniques indiquées.

Cependant, il ressort de comparaisons effectuées que :

- la purification des PTV est nécessaire à leur mise en évidence, cela étant probablement dû aux quantités faibles extraites du mycélium (l'épreuve sérologique réalisée sur des extraits bruts provenant de souches virosées est négative),

- le passage sur gradient permet de déceler de faibles quantités de virus. La technique présente une bonne reproductibilité : elle est également quantitative,

- les résultats des examens en microscopie électronique sont imparfaitement corrélés à ceux fournis par les autres techniques,

- le dosage des virus en spectrophotométrie ne peut être utilisé à des fins quantitatives en raison des absorptions de constituants normaux du champignon.

Nos essais ayant des buts soit qualitatifs, soit quantitatifs, nous avons décidé d'adopter :

- dans le premier cas, après passage sur gradient, la recherche de la présence des pics 0,1 et 2, ainsi que l'épreuve sérologique,

- dans le second, la mesure de la surface des aires de ces différents pics ce qui permet de distinguer les quantités globales de PTV, celles de chacune et, enfin, les particules dégradées. Ces valeurs peuvent être transformées en indices par rapport à un témoin. L'analyse sérologique constitue alors une vérification qualitative des résultats.

-:-:-:-:-:-:-:-:-:-:-:-:-

3 - RESULTATS

Ils sont présentés selon sept thèmes :

- Analyse du contenu viral d'isolats mycéliens en relation avec certains aspects de la biologie du champignon .

- Evolution de certains aspects de la biologie et du contenu viral d'isolats mycéliens.

- Evolution du contenu viral lors de la reproduction sexuée du champignon.

- Transmission des particules virales à une souche "saine".

- Influence des conditions de culture et de conservation du champignon sur le contenu viral.

- Essais de "guérison" de souches virosées par voies physique et chimique.

- Mise en évidence de particules virales chez *Phialophora radicicola* et étude de leurs relations avec les éléments viraux contenus dans *G. graminis*.

.../...

3.1. ANALYSE DU CONTENU VIRAL D'ISOLATS MYCELIENS EN RELATION AVEC CERTAINS ASPECTS DE LA BIOLOGIE DU CHAMPIGNON

L'existence d'une relation entre la présence de PTV et le niveau d'agressivité des souches est fréquemment évoquée comme un aspect important des interactions virus-champignon (BOZARTH et al., 1972 ; BOUSQUET, 1973 ; DUNKLE, 1974). Chez *Gaeumannomyces graminis*, une corrélation entre présence de virus et réduction de l'agressivité est établie par LAPIERRE et al. (1970) puis mise en question par RAWLINSON et al. (1973).

Dans le cadre de la poursuite des travaux de LAPIERRE et LEMAIRE, il nous a paru intéressant d'analyser simultanément, chez une série de souches le contenu en PTV et certains facteurs liés à la biologie du champignon : la croissance sur milieu artificiel, l'agressivité et l'aptitude à la reproduction sexuée.

Dix-huit souches provenant de la phase mycélienne intraracinaire isolées de 1966 à 1979 et conservées dans la mycothèque du laboratoire de Pathologie végétale de Rennes sont testées entre 1977 et 1979 dans des conditions aussi voisines que possible. Ces souches sont choisies sur la base de leur agressivité : dix sont agressives (sept de type A1 et trois de type A2) et huit hypoagressives.

Les résultats, mentionnés au tableau 3, montrent qu'en plus de leur agressivité, les souches diffèrent entre elles par leur vitesse de croissance et leur aptitude à la reproduction sexuée. Ainsi, certaines souches présentent une croissance de plus de 70 mm en 10 jours à 23°C, tandis que d'autres se développent beaucoup plus faiblement (minimum : 37 mm). Si l'on considère la fructification sexuée, le phénomène est nettement tranché : toutes les souches agressives A1 produisent abondamment des périthèces, alors que les autres sont incapables de fructifier.

.../...

Référence des souches	Date d'isolement	Date du test d'agressivité	Croissance au 10è jour (rayon des colonies en mm : 3 répétitions)	Agressivité		Fructification sexuée	Niveau d'agressivité	Présence de particules virales (2 types)
				% moyen de nécroses racinaires	Nombre total de bases de tiges colonisées (sur 6 plantules)	Nombre total de périthèces (dans 3 tubes)		
612	1966	7/1977	56	12	0	0	a	+
911	1969	7/1977	59	28	0	0	a	+
011	1970	8/1977	50	4	0	0	a	+
111	1971	8/1977	37	5	0	0	a	+
211	1972	8/1977	72	14	0	0	a	+
311	1973	8/1977	57	43	0	0	a	+
411	1974	8/1977	52	28	0	0	a	+
511	1975	8/1977	78	88	3	2	A2	+
611	1976	8/1977	76	92	5	1	A2	+
615-1	1976	9/1977	50	6	0	0	a	+
6-7-1	1976	9/1977	62	85	3	0	A2	+
6-17-1	1976	9/1977	74	84	5	76	A1	0
711	1977	8/1977	82	85	6	100	A1	0 (1)
77-115	1977	4/1978	70	87	6	60	A1	0
78-14	1978	9/1978	58	90	6	74	A1	+
79-171	1979	7/1979	64	91	6	62	A1	0 (2)
79-351	1979	7/1979	60	85	6	76	A1	+
79-353	1979	7/1979	63	85	6	50	A1	+

TABLEAU 3 : CARACTERES ET CONTENU VIRAL DES SOUCHES ETUDIEES

(1) L'évolution du contenu en PTV de cette souche est étudiée par ailleurs (§ 32)

(2) Un nouvel essai réalisé six mois plus tard a montré la présence de PTV.

La recherche de PTV indique que quatorze souches en sont porteuses, les deux types de particules étant toujours présents simultanémant.

Niveau d'agressivité	Nombre total de souches	Croissance moyenne au 10è jour	Nécroses racinaires % moyen	Fructification sexuée. Nombre moyen de périthèces	Particules virales	
					Absentes	Présentes
A1	7	67,3	86,7	71,1	4	3
A2	3	72	88,3	1	0	3
a	8	54,1	17,5	0	0	8

TABLEAU 4 : CARACTERES ET CONTENU VIRAL DES SOUCHES ETUDIEES, REGROUPES SELON LE NIVEAU D'AGRESSIVITE

Le tableau 4, qui résume les résultats obtenus, montre qu'une certaine relation peut être établie entre les caractères des souches et leur contenu en virus : parmi les sept souches agressives de type A1, trois sont porteuses de PTV et quatre en sont dépourvues au moment de l'extraction. La croissance de toutes ces souches est comparable à celle des souches de type A2 et leur aptitude à la reproduction sexuée est bonne. Les trois souches agressives A2 contiennent des particules ; elles ne forment pratiquement plus de périthèces. Les huit souches hypoagressives sont virosées ; leur développement in vitro est nettement réduit et elles sont incapables de fructifier.

Ces résultats rejoignent en partie ceux de LAPIERRE et al. (1970) et LEMAIRE et al. (1970) qui indiquent aussi l'état virosé des souches hypoagressives. On observe cependant des exceptions puisque certaines souches agressives (A1 et A2) sont porteuses de PTV.

La prise en compte du stade A2 pourrait expliquer certains résultats de RAWLINSON et al. (1973) concernant des souches virosées qu'ils définissent agressives. Ces derniers auteurs montrent que certaines souches isolées en première année de culture céréalière ne contiennent qu'un seul type de particules (celles de plus faible diamètre), alors qu'en culture continue, les deux PTV sont rencontrées dans plus de la moitié des cas.

Dans nos essais, lorsque des virus sont présents, les deux particules le sont ensemble.

JADOT (1979) a réalisé un travail voisin en distinguant quatre niveaux d'agressivité : nul, faible, assez élevé (et variable), élevé (et stable). Il effectue des recherches de virus chez quelques souches appartenant aux trois derniers groupes : seules celles d'agressivité faible contiennent éventuellement un ou les deux virus.

Nos résultats peuvent être aussi rapprochés de ceux obtenus par GHABRIAL et al. (1979) chez *Helminthosporium victoriae* : les isolats présentant des caractères "maladifs" (croissance et ramification hyphale notamment, selon LINDBERG, 1959) contiennent deux types de particules (145 et 190 S) alors que les souches saines n'en renferment pas ou seulement des éléments de la plus forte constante de sédimentation.

Au total, trois conclusions peuvent être tirées de nos essais réalisés à un moment donné de l'évolution de chaque souche :

- Lorsque l'agressivité est faible (a) ou en phase atypique (A2), les deux types de PTV sont présents.

- Les souches agressives de type A1 contiennent ou non des particules.

- Toutes les souches ayant perdu leur aptitude à la reproduction sexuée sont virosées.

3.2. EVOLUTION DE CERTAINS ASPECTS DE LA BIOLOGIE ET DU CONTENU VIRAL D'ISOLATS MYCELIENS

Quand une souche agressive de *Gaeumannomyces graminis* est conservée en mycothèque, ce caractère évolue passant d'un niveau élevé à un état hypoagressif (CHAMBERS et FLENTJE, 1967 a et b ; CHAMBERS, 1970 ; TIVOLI, 1976 Y-a-t-il, de même, modification du contenu viral ?

.../...

Un premier résultat est fourni par la souche 6-17-1 (isolée en 1976) dont l'agressivité, évaluée en septembre 1977, était de type A1 et qui ne contenait pas de virus quinze mois après son isolement. Six mois plus tard, elle se trouvait en phase A2 et porteuse de PTV. En 1979, enfin, devenue hypoagressive, elle contenait toujours des virus.

Une étude plus systématique a été entreprise sur la souche 711, isolat provenant de la phase mycélienne intraracinaire, prélevé au champ en juin 1977 et maintenu en mycothèque à l'obscurité et à la température du laboratoire.

Les caractères de croissance, agressivité et fructification sexuée sont évalués périodiquement : quatre, huit, onze, quatorze et dix-sept mois après son isolement.

Un seul repiquage du champignon est effectué entre chaque analyse. Simultanément, en vue de la recherche de particules virales, le champignon est mis en culture en fioles de Roux. On utilise comme témoin la souche 911, systématiquement comparée à la souche 711 lors des tests d'agressivité et des extractions de virus.

Les résultats des tests pratiqués sur la souche 711 montrent une évolution de l'état d'agressivité élevée A1 jusqu'à l'hypoagressivité typique a, obtenue <u>in vitro</u> en dix-sept mois au plus. Ce passage est progressif et le stade intermédiaire A2 est atteint en moins d'une année.

Le contenu en particules virales connaît lui aussi une évolution puisqu'il y a passage d'un état apparemment sain à un état virosé où les deux types d'éléments sont présents. Quatre mois après son isolement, la souche 711 est dépourvue de PTV, puis les deux types apparaissent successivement : d'abord les particules de fort diamètre (quatre mois plus tard), puis le second type de virus (six mois après). Quatorze mois après l'isolement, les deux virus sont présents en quantité importante. Les réactions sérologiques observées confirment la mise en évidence successive des virus (figure 6).

.../...

Extraction	Temps après l'isolement (mois)	Croissance moyenne au 10e jour	Fructification sexuée (Nb. moyen de périthèces)	Niveau d'agressivité	Analyse en gradient 10-20-30-40 p.cent 45000 rpm 45 mn, rotor SW 50 - 1	Sérologie
1	4	81,7	100	A_1		0
2	8	68	2	A_2		réaction incertaine
3	11	70,8	2	A_2		+ 1 ligne
4	14	70	0	A_2		+ 2 lignes
5	17	61	0	a		+ 2 lignes

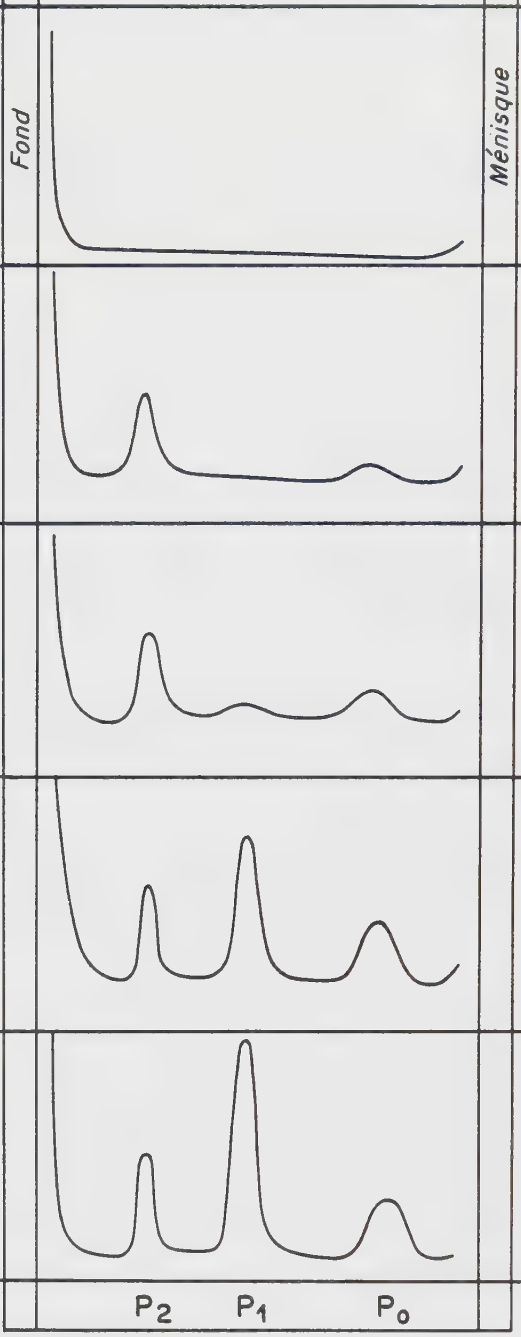


FIGURE 6 : EVOLUTION DE CARACTERES BIOLOGIQUES ET DU CONTENU VIRAL DE LA SOUCHE 711, CONSERVEE EN MYCOTHEQUE.

Trois idées peuvent être dégagées des résultats obtenus :

- Les caractères de croissance, d'agressivité et de fructification sexuée d'une souche agressive conservée en mycothèque évoluent. Cette observation rejoint celles des auteurs mentionnés au début de ce paragraphe.

- De même que le niveau d'agressivité du champignon varie, le contenu en virus évolue : la souche étudiée, dépourvue de particules virales après son isolement, contient ensuite un virus, puis les deux.

- Les deux virus ne sont pas nécessairement présents simultanément et quand ils le sont, leurs proportions, au sein d'une même souche, fluctuent. Ce point est nouveau par rapport à ce qui précède : la mise en évidence simultanée des deux virus chez quatorze des souches étudiées ne souffre pas d'exception et ce résultat est en opposition avec ceux de RAWLINSON et al. (1973). On peut supposer que le nombre d'essais est insuffisant et que le hasard fait qu'aucune souche à un seul type de PTV n'a été trouvée.

Différentes hypothèses peuvent être formulées pour expliquer cette mise en évidence tardive des particules virales :

- Les virus sont présents dans la souche agressive récemment isolée mais sous forme non encapsidée ou en très faibles quantités. La conservation en mycothèque induirait une dérépression selon l'un ou l'autre cas.

- Les virus ne sont présents que dans quelques hyphes mycéliennes de la souche agressive et "contaminent" progressivement les zones qui en sont dépourvues. Des exemples de contagion de ce type sont rapportés chez *Endothia parasitica* (GRENTE, 1980) et *Rhizoctonia solani* (CASTANHO et al., 1978). Dans ce cas, avec un grand nombre de boutures d'extrémités d'hyphes, on devrait maintenir des souches sans virus.

Sans vouloir généraliser ce modèle à l'ensemble des souches, cette étude montre qu'il semble plus intéressant de comparer les évolutions de l'agressivité et de la teneur en particules virales que d'étudier seulement, à un moment donné, ces deux caractères.

3.3. EVOLUTION DU CONTENU VIRAL LORS DE LA REPRODUCTION SEXUEE DU CHAMPIGNON

Différents auteurs (LAPIERRE et al., 1970 ; LEMAIRE et al., 1970 ; RAWLINSON et al., 1973) ont observé que les virus ne se transmettaient pas aux ascospores. Cependant, l'isolat monoascosporé 911-1 décrit par LAPIERRE et al. (1970) comme agressif et dépourvu de PTV et conservé en mycothèque depuis cette époque, est maintenant hypoagressif et virosé (TIVOLI et al., 1979).

Ce premier résultat nous a incités à reprendre l'étude de cette question.

Un premier essai consiste à comparer cet isolat considéré comme témoin (911-1 T) à deux autres origines de la même souche dont les caractéristiques de conservation sont les suivantes :

- 911-1 A provient d'anciennes cultures de 911-1 T, mais maintenues à partir de 1975 pendant environ trois années sur grains d'orge desséchés, à + 4°C.

- 911-1 B est un isolat maintenu dans les mêmes conditions, mais pendant environ une année seulement.

Ces trois souches sont mises en culture en tube, boîte de Petri et fiole de Roux dans les conditions précisées précédemment. Leurs vitesses de croissance sont représentées par la figure 7. Les niveaux d'agressivité et les contenus en virus sont indiqués par le tableau 5.

.../...

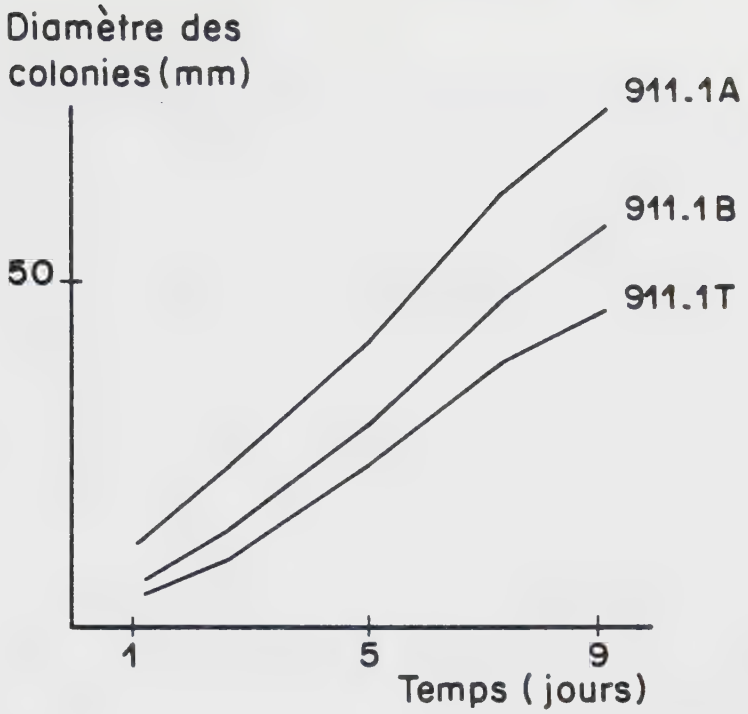


FIGURE 7 : COURBES DE CROISSANCE DE TROIS ISOLATS DE LA SOUCHE 911-1

Isolats	Caractères	Niveau d'agressivité	Contenu viral (2 types)
911-1 T	Maintien en mycothèque	a	++ (*)
911-1 A	Id, puis 3 ans à 4°C sur grains d'orge	A1	ε
911-1 B	Id, puis 1 an à 4°C sur grains d'orge	A2	+

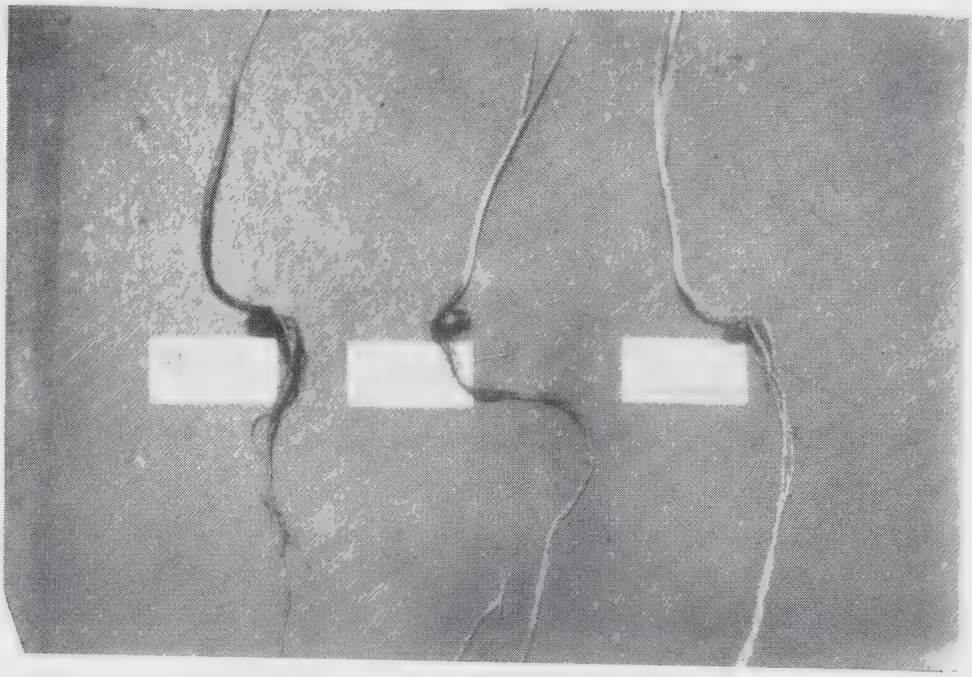
TABLEAU 5 : NIVEAU D'AGRESSIVITE ET CONTENU VIRAL DE TROIS ISOLATS DE LA SOUCHE 911-1

(*) ++ indique que la quantité totale de virus est environ le double de ce qu'elle est chez 911-1 B.

L'isolat ascosporé 911-1, agressif et dépourvu de PTV lors de son isolement, est devenu hypoagressif et porteur de virus en mycothèque. Ce résultat qui concerne un isolat ascosporé traduit une évolution du même type que celle de l'isolat mycélien d'origine intraracinaire 711. Le constat de cette double évolution a été fait sept ans après isolement.

Les origines 911-1 A et 911-1 B issues de la souche témoin 911-1 T, mais conservées des temps plus ou moins longs à basse température n'ont pas évolué aussi rapidement. Cette observation qui vaut pour les réductions de croissance et d'agressivité (encore de type A1 après trois ans dans ces conditions et de niveau A2 après un an) rejoint celles de CHAMBERS et FLENTJE (1969), CHAMBERS (1970) et TIVOLI (1976) qui notent que l'hypoagressivité des souches ne se manifeste qu'après plusieurs cultures sur milieu artificiel. Le contenu en PTV est également concerné : dans la souche 911-A, les virus sont mis en évidence à une très faible concentration (limite de détection de la méthode). Chez 911-1 B par contre, ils sont présents en quantité importante, mais très significativement différente (tableau 5) de ce que l'on extrait de la souche témoin.

L'évolution de ces trois formes de l'isolat ascosporé 911-1 s'est faite dans le même sens : croissance et agressivité diminuent tandis que les particules virales "apparaissent", puis se trouvent en quantités importantes. Le maintien du champignon à basse température ralentit (bloque ?) ces phénomènes. Remarquons que ces changements se sont produits lentement en compa-



DÉGÂTS SUR PLANTULES DE BLÉ DÛS A LA SOUCHE 911-1

LA SOUCHE 911-1 EST UN ISOLEMENT MONOASCOSPORÉ DE LA SOUCHE 911, MAINTENU EN MYCOTHÈQUE. ELLE EST MAINTENANT HYPOAGRESSIVE.

911-1A A ÉTÉ CONSERVÉE TROIS ANS À 4°C. ELLE EST ENCORE AGRESSIVE, DE TYPE A1.

911-1B A ÉTÉ CONSERVÉE DANS LES MÊMES CONDITIONS, MAIS UN AN SEULEMENT. ELLE EST AUSSI AGRESSIVE, MAIS DE TYPE A2.

raison de ce qui a pu être observé précédemment pour des souches mycéliennes conservées en mycothèque : 6-17-1 et 711, notamment. On trouve sans doute là une possibilité de conservation des potentialités des souches.

D'autres manipulations sont effectuées sur des isolats obtenus :

- soit à partir de la souche 911-1 (d'origine ascosporée) alors qu'elle était encore agressive (de type A2), mais dont le contenu viral n'avait pas été déterminé.

- soit de la souche 79-17-1 (d'origine mycélienne intraracinaire) agressive et dépourvue de PTV lors de l'isolement des ascospores.

Dans le premier cas, on étudie les caractéristiques d'agressivité et le contenu viral de huit isolats monoascosporés, provenant d'un même asque, issus de la souche 911-1, développée sur racines de Blé, six mois avant qu'elle ne devienne hypoagressive.

Les isolats monoascosporés sont mis en culture en fiole de Roux deux mois après leur isolement ; trois semaines plus tard, on teste simultanément leur agressivité et leur contenu viral. Toutes ces opérations sont effectuées à nouveau trois mois plus tard (un essai par cas). Les résultats obtenus figurent au tableau 6.

Temps après isolement (mois)	Analyses	Isolats monoascosporés							
		1	2	3	4	5	6	7	8
3	Niveau d'agressivité	A1	A1	A1	A1	A1	A1	A1	A1
	Contenu viral (*)	0	0	+	+	+	+	+	+
6	Niveau d'agressivité	A1	A1	A1	A1	A1	A1	A1	A1
	Contenu viral	+	0	+	+	+	+	+	+

(*) La réponse positive correspond à la mise en évidence, après analyses en gradient et par sérologie, des deux types distincts de particules virales.

TABLEAU 6: NIVEAU D'AGRESSIVITE ET CONTENU VIRAL DE HUIT ISOLATS MONO-ASCOSPORES OBTENUS A PARTIR DE LA SOUCHE 911-1

.../...

Parmi les huit isolats, tous de niveau d'agressivité élevé et ayant une capacité à la reproduction sexuée importante, six sont virosés trois mois après leur isolement. Un septième contient des particules trois mois plus tard.

Un résultat analogue est obtenu à partir de l'isolat ascosporé 11 de la souche 911-1 conservée au laboratoire de Cryptogamie de l'Université d'Orsay (Madame BOISSONNET). La recherche de virus effectuée quatre mois après son obtention s'est avérée positive alors que l'agressivité du champignon était élevée (A1).

D'autre part, six isolements monoascosporés, provenant d'un même asque, sont réalisés à partir de la souche 79-17-1 (référencés 79-17-1 As 1 à As 6), agressive et dépourvue de PTV lors d'un essai trois mois après son obtention (mais qui est porteuse de virus six mois plus tard).

Dans les six cas, trois mois après l'isolement, l'agressivité est de type A1 et les deux virus sont présents.

On peut ainsi résumer les résultats obtenus :

(1) Souche d'origine mycélienne intraracinaire <u>911</u>, isolée en 1969, a et virus + dès 1969

↓

Isolat ascosporé <u>911-1</u> obtenu en 1970, A1 et virus 0, devenu A2 et virus ? en 1976, puis a et virus + en 1977

↙ ↓ ↘

Conservé à + 4°C :	Isolements 911-1 As 1 à As 8 en 1977	Isolement 911-1-11 en 1977
de 1975 à 1977 : A1 et virus ε	+ 3 mois : huit sont A1, six sont virus +	+ 4 mois: A1 et virus +
en 1975 : A2 et virus +	+ 3 mois : huit sont A1, sept sont virus +	

(2) Souche d'origine mycélienne 79-17-1 isolée en 1979

+ 3 mois A1 et virus 0 , + 6 mois A2 et virus +

↓

Isolement 79-17-1 As 1 à As 6

+ 3 mois : six sont A1
six sont virus +

L'état virosé de la plupart des isolats étudiés, observé peu de temps après leur obtention, infirme l'idée de non-transmission des particules virales lors de la reproduction sexuée. Ce résultat montre à nouveau que les virus peuvent être présents lorsque le niveau d'agressivité du champignon est élevé (type A1). Il faut souligner, également, que l'on arrive à cette conclusion en partant d'origines différentes : isolat ascosporé d'agressivité A2 et porteur de virus, isolat mycélien de type A1 et dépourvu de PTV.

On peut formuler l'hypothèse que la réplication virale est fortement réprimée ou que les virus sont sous une forme non encapsidée pendant les processus liés à la reproduction sexuée ou même dans les ascospores. Après leur isolement, sous l'action de facteurs externe(s) ou intracellulaire(s), la dérépression ou la formation de virus complets interviendrait plus ou moins rapidement.

Enfin, l'état virosé de ces isolats ne semble pas lié à une modification de leur niveau d'agressivité.

3.4. TRANSMISSION DES PARTICULES VIRALES A UNE SOUCHE "SAINE"

Les effets de la présence des virus sur les différents aspects du métabolisme des champignons-et en particulier leur pouvoir pathogène-sont mal précisés. En effet, les résultats obtenus, au moins avec les virus complets, sont contradictoires et reposent le plus souvent sur la comparaison de caractères d'isolats porteurs et dépourvus de PTV qui peuvent aussi différer par leurs patrimoines génétiques.

Pour pallier cet inconvénient, on dispose de deux voies : la transmission des particules virales à un clone sain et la guérison d'un clone virosé (voir paragraphe 36).

Les essais de transmission directe des virus à du mycélium qui en est dépourvu, n'ont pas abouti (LAPIERRE et FAIVRE-AMIOT, 1970 ; HOLLINGS et STONE, 1971), peut-être en raison de l'absence de sites d'adsorption sur la paroi hyphale. D'autres, par le même procédé, mais à des espèces différentes de celle ayant produit les PTV, ont été positifs puis remis en question en raison de l'état initial faiblement virosé des souches receveuses (LHOAS, 1972).

Une autre technique, difficilement applicable aux micromycètes, consiste à injecter dans des carpophores sains d'*Agaricus bisporus* des préparations purifiées de virus (HOLLINGS, 1962 ; DIELEMAN-VAN ZAAYEN, 1968). Le taux de réussite est faible.

Aussi, les transmissions expérimentales qui ont abouti à des résultats positifs, ont fait appel à d'autres procédés : l'anastomose entre des hyphes et l'utilisation de protoplastes des champignons. Ces deux voies doivent être adaptées dans le détail aux particularités de chaque couple champignon-virus.

La transmission par anastomose d'hyphes d'origines différentes a d'abord été observée chez le champignon de couche *Agaricus bisporus* par GANDY (1960) et GANDY et HOLLINGS (1962). Le phénomène, qui se produit dans les champignonnières, constitue une cause majeure de la dissémination des virus. Chez les micromycètes, cette transmission a été obtenue pour la première fois par LHOAS (1970) chez *Aspergillus niger*, puis chez différentes espèces en faisant appel à des marqueurs tels que la coloration des souches, la résistance à des fongicides, les mutants auxotrophes et en utilisant éventuellement l'hétérocaryose : par exemple, chez *Penicillium chrysogenum* (LEMKE et NASH, 1974) et *Colletotrichum lindemuthianum* (DELHOTAL et al., 1976).

Lorsque les anastomoses sont rarement observées ou que le marquage s'avère difficile, l'utilisation des protoplastes de champignons est envisagée : l'infection directe de protoplastes obtenus à partir d'une souche saine de *Penicillium stoloniferum* a été réussie par LHOAS (1971), mais

.../...

l'expérience n'a pu être reproduite ultérieurement. PALLETT (1972) a fait de même chez *Penicillium chrysogenum* en transmettant également les virus de cette espèce à *Marasmius androsaceus* et *Mucor hiemalis*.

Dans ces derniers cas, la concentration virale est très faible et les particules "disparaissent" après trois années de maintien des champignons in vitro.

Des exemples d'échecs dans cette voie sont rapportés par la littérature : BOZARTH (1975) chez *Penicillium stoloniferum*, *P. chrysogenum* et *Helminthosporium maydis*, ainsi que BOISSONNET-MENES et LECOQ (1976) chez *Piricularia oryzae*, notamment. Ces derniers auteurs ont cependant réussi à transmettre les virus associés à l'agent de la piriculariose du riz par fusion de protoplastes obtenus à partir de souches virosée et saine, préalablement marquées.

Chez *Gaeumannomyces graminis*, la transmission des PTV a été obtenue par RAWLINSON et al. (1973) à partir d'isolats provenant de culture continue de blé. Lorsque des isolats se révèlent compatibles in vitro, ils sont confrontés en boîte de Petri après marquage fluorescent de l'un des deux. Seize combinaisons compatibles sont obtenues à partir des confrontations de dix souches dont trois sont dépourvues de particules virales et une ne contient que les éléments de 27 nm. Les deux types de PTV sont retrouvés dans une souche réceptrice saine ainsi que dans celle qui ne contenait pas de particules de 35 nm. Les auteurs ne rapportent pas de modifications des caractères du champignon après ces anastomoses. Cependant, les durées de ces manipulations sont importantes et variables (15 à 50 jours) et il est possible qu'il y ait eu anastomoses entre hyphes non marquées.

Afin de ne pas rencontrer les difficultés d'interprétation des transmissions de PTV par anastomoses entre souches différentes, on a préféré essayer d'infecter directement des protoplastes du champignon obtenus par traitement du mycélium par l'hélicase (Industrie biologique française). La méthode est adaptée de celles de FERENCZY et al. (1976) et ROCHEFRETTE et al. (1979).

Trente six heures après ensemencement en milieu liquide malté (4 p. 100), agité, à 23°C et à l'obscurité, le mycélium est recueilli, puis mis en suspension dans un tampon phosphate monopotassique-disodique 0,1M à pH 6,5. Après addition de 5 p. 100 d'hélicase, le mélange est agité pendant quatre heures à la température du laboratoire. Les protoplastes libérés sont séparés par filtration sur verre fritté (porosité n° 3) et récupérés par centrifugation à 2000 g pendant dix minutes. Ils sont repris dans un tampon chlorure de potassium 0,6M auquel on ajoute un demi volume de solution virale purifiée. Le mélange, maintenu à 23°C, est agité légèrement pendant une heure, puis étalé après dilution par le tampon KCl sur milieu gélose-malt (2 p. 100) - saccharose (21 p. 100) en boîte de Petri.

A partir de l'addition de l'enzyme, la formation et l'état des protoplastes sont contrôlés en microscopie et leur nombre est évalué à l'hématimètre : l'étalement est fait à raison de 75 à 100.000 par boîte de Petri.

Chaque élément régénéré est transféré et cultivé individuellement. On réalise ensuite les tests de croissance et d'agressivité et l'on recherche les PTV.

La souche utilisée est la 77-11S dont le niveau d'agressivité était toujours élevé (A1) au moment de l'essai de transmission, dix mois après son isolement.

Douze souches obtenues dans ces conditions ont été analysées : six proviennent du mélange des protoplastes à la solution virale ; six, d'un mélange à du tampon 0,1M, constituent des témoins.

Les résultats obtenus figurent au tableau 7.

Les six origines ayant été au contact des PTV sont "devenues" virosées. Mais par ailleurs, l'état virosé de quatre souches témoins sur six a été observé deux mois environ après la régénération des protoplastes. Trois mois plus tard, les deux origines sans virus contenaient des particules.

.../...

Ces résultats permettent de faire plusieurs observations :

- alors que la souche 77-11S est dépourvue de PTV, les souches témoins et "virosées" issues de protoplastes sont pour la plupart virosées peu de temps après leur obtention.

- les traitements subis par le champignon ont provoqué une dérépression de la replication virale. Ce phénomène est-il dû au temps, aux manipulations ou à l'action de composant(s) de l'hélicase ?

- la présence de PTV peut être observée lorsque l'agressivité est élevée (A1).

Ces remarques rejoignent celles formulées dans les paragraphes précédents et soulignent le caractère probablement latent des virus associés à *G. graminis*. Dans ces conditions, les essais de transmission ne pourront être envisagés que lorsqu'une souche réellement saine aura été trouvée, ce qui suppose la mise au point de méthodes de détection plus fines des VLP et la recherche des acides nucléiques viraux non encapsidés.

Origine des souches	Protoplastes + virus						Protoplastes + tampon 0,1M						Souche mycothèque
	1	2	3	4	5	6	1	2	3	4	5	6	
Croissance au 10ème jour (rayon en mm)	72	68	68	67	68	69	67	67	63	66	69	71	70
Niveau d'agressivité	A1	A1	A1	A1	A1	A1	A1	A1	A1	A1	A1	A1	A1
Fructification sexuée (*)	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Contenu en virus (+ = 2 types de particules)	+	+	+	+	+	+	0	0	+	+	+	+	0

(*) Un résultat positif correspond à l'obtention de plus de dix périthèces pour six plantules.

TABLEAU 7 : CARACTERES DES SOUCHES ISSUES DE PROTOPLASTES DE LA SOUCHE 77-11S

3.5. INFLUENCE DES CONDITIONS DE CULTURE ET DE CONSERVATION DU CHAMPIGNON SUR LE CONTENU VIRAL

Les différences observées entre nos résultats et ceux de LAPIERRE et al. (1970) et RAWLINSON et al. (1973) en ce qui concerne l'évolution du contenu viral de souches et la présence des PTV dans les isolats ascosporés sont peut-être imputables aux conditions dans lesquelles est placé le champignon avant extraction.

Aussi, différents essais sont réalisés concernant les quantités de virus présentes dans le mycélium lorsque les conditions de culture et de conservation changent.

3.5.1. *Conditions de culture du champignon*

Une première manipulation est pratiquée sur les souches :

911 hypoagressive et virosée
78-14 agressive (A1) et virosée
78-14 C14 isolat ascosporé de la précédente, agressive (A1) et virosée.

Les deux dernières étant présumées sans virus lors de leur isolement.

Des explantats de 1 cm^2 environ sont prélevés dans des boîtes de Petri, au front de croissance du champignon et servent à ensemencer, chacun, une fiole de Roux. Ce matériel est ensuite maintenu en chambre climatisée à + 20°C $\pm$ 2 et à l'obscurité. Le contenu de la moitié des fioles ensemencées est essoré au bout de vingt-huit jours et conservé à + 4°C. Il constitue un témoin dont l'évolution est probablement très ralentie.

L'autre fraction est conservée à 20°C pendant sept mois.

On réalise ensuite périodiquement des prélèvements :

- du mycélium issu de quatre fioles placées à 20°C, un, deux, quatre et sept mois après l'ensemencement,

- du mycélium essoré, conservé à 4°C et correspondant à la production de quatre fioles un, trois et six mois après l'essorage.

Le niveau d'agressivité du champignon est évalué lors de chaque prélèvement à 20°C.

Au cours des sept mois, l'agressivité demeure de niveau soit a, soit A1. Quant au contenu en PTV, il n'a pu être quantifié en raison d'aléas techniques, mais la présence des virus est vérifiée dans tous les cas (souches et conditions de milieu, au total vingt et un essais).

Une observation différente est faite à partir des souches hypoagressives 612 et 911, cultivées en fioles de Roux et maintenues à la température du laboratoire, respectivement onze et sept mois : les recherches de virus s'avèrent négatives. Un test d'agressivité pratiqué sur ces mycéliums encore vivants n'indique aucune modification (stade a). Par contre, la remise en culture de ces échantillons fournit un résultat opposé : trois semaines après l'ensemencement, les virus sont présents en quantités importantes, l'agressivité demeurant toujours très faible.

En résumé, sans qu'il y ait modification du niveau d'agressivité des souches utilisées, les PTV sont présentes dans le mycélium plusieurs mois après qu'il ait terminé sa croissance. Il en va de même en cas de conservation à 4°C après essorage. Par contre, en poursuivant la conservation de deux souches hypoagressives, on observe une "disparition" des particules (selon nos méthodes, tout au moins). Dès transfert du champignon sur un nouveau milieu de culture, la synthèse virale reprend.

A partir de l'isolat ascosporé 79-17-1 As 2 obtenu en 1979, agressif et reconnu virosé en janvier 1980, on effectue des cultures en fioles de Roux dans quatre conditions de température et d'éclairement :

+ 15°C à l'obscurité
+ 20°C à l'obscurité
+ 20°C sous lumière continue
+ 23°C à l'obscurité

Le mycélium est essoré vingt-neuf jours après ensemencement, puis desséché sur chlorure de calcium et conservé à + 4°C jusqu'à extraction.

Les résultats rapportés par le tableau 8 indiquent que les quantités de virus non dégradés sont comparables après culture à 20°C à l'obscurité et à la lumière, et beaucoup plus faibles à 15 et 23°C. Quant aux quantités totales, elles sont nettement plus élevées à 20°C que dans les autres conditions. La décapsidation est très forte à 15°C ; par contre, il n'y a pas de particules sans acide nucléique à 20°C et à l'obscurité. Ce dernier point mériterait développement.

Traitements	Eléments viraux			Virus non dégradés $P_1 + P_2$	Virus totaux $P_0+P_1+P_2$
	P_0	P_1	P_2		
15°C obscurité	795	176	53	92	179
20°C obscurité	0	- (*)	-	283	250
20°C lumière	258	-	-	283	279
23°C obscurité	100	100	100	100	100

(*) Pour les deux cas à 20°C, les pics 1 et 2 ne sont pas suffisamment séparés pour pouvoir les estimer isolément. On indique les valeurs de l'ensemble.

TABLEAU 8 : QUANTITES DE VIRUS PRODUITES DANS DIFFERENTES CONDITIONS DE TEMPERATURE ET D'ECLAIREMENT (Isolat 79-17-1 As 2)

(exprimées en indices par rapport au témoin choisi : 23°C obscurité, qui correspond aux conditions de culture utilisées dans la plupart des essais).

Cet essai montre que les quantités de virus varient fortement selon des conditions de milieu pourtant peu éloignées. Les rapports entre champignon et PTV sont donc très fluctuants.

Une expérience voisine, mais portant sur un plus grand nombre de traitements, est réalisée sur la souche 911, cultivée en fioles de Roux à quatre températures ; +15°, 20°, 23°, et 30°C, sous éclairage ou non, pendant vingt jours.

Des résultats mentionnés dans le tableau 9, il ressort que les quantités de virus les plus élevées sont produites à 23 et 30°C, à la lumière et à l'obscurité. La dégradation est très variable selon les cas : on trouve beaucoup de particules creuses à l'obscurité à 20 et 30°C.

Traitements		Eléments viraux			Virus non dégradés P_1+P_2	Virus totaux $P_0+P_1+P_2$
		P_0	P_1	P_2		
15°C	Obscurité	133	65	53	61	68
15°C	Lumière	66	100	40	75	75
20°C	Obscurité	366	63	53	59	92
20°C	Lumière	177	89	27	64	76
23°C	Obscurité	100	100	100	100	100
23°C	Lumière	144	187	113	158	156
30°C (*)	Obscurité	466	152	117	138	173
30°C (*)	Lumière	266	100	50	80	100

(*) La croissance du champignon étant très faible à cette température, les fioles sont transférées à 20° après douze jours d'exposition à 30°.

TABLEAU 9 : QUANTITES DE VIRUS PRODUITES DANS DIFFERENTES CONDITIONS DE TEMPERATURE ET D'ECLAIREMENT (Souche 911)

.../...

(Exprimées en indices par rapport au témoin arbitrairement choisi : 23°C obscurité).

Si l'on compare ces résultats à ceux obtenus avec l'isolat agressif 79-17-1 As 2, on constate une grande dispersion des données. Dans ce dernier cas, par exemple, 20° constitue une température optimum de "production" virale alors que pour la souche hypoagressive 911, ce sont les niveaux élevés qui stimulent le plus la synthèse virale.

En résumé, les effets des conditions de culture du champignon sur les virus se manifestent de façon variable selon les souches et les choix faits pour les essais.

Il est en conséquence indispensable de réaliser les manipulations dans des milieux bien définis, dont les paramètres établis sont soigneusement respectés.

3.5.2. Conditions de conservation du champignon

La conservation à + 4°C, pendant une longue période, des PTV contenues dans le mycélium a été signalée précédemment (voir paragraphe *2.2.1.*). Leur présence a été reconnue jusqu'à sept mois après séparation du champignon de son milieu de culture.

Une autre possibilité consiste à étudier, toujours à l'aide de la souche 911, l'influence de la dessiccation du mycélium sur chlorure de calcium : après croissance à la température du laboratoire, le champignon essoré est, soit maintenu en cet état, soit desséché sous vide en présence de Cl_2Ca pendant trente heures (*). Dans les deux cas, la conservation ultérieure est effectuée à + 4°C et les volumes de tampon d'extraction sont les mêmes (le rapport $\frac{\text{poids du mycélium desséché}}{\text{poids du mycélium essoré}}$ est compris entre 0,15 et 0,20).

Les résultats indiqués par le tableau 10 font apparaître :

- peu de différences quant aux quantités de virus encapsidés produites (ceci est valable pour les deux particules),

- une dégradation des virus beaucoup plus importante dans le cas de l'essorage.

(*) Le champignon ainsi desséché demeure viable plusieurs mois au moins.

.../...

Au total, les trois cas envisagés : mycélium en culture, essoré et desséché sont utilisables pour des essais de recherche et de quantification des PTV, au moins à partir d'une souche hypoagressive.

La dernière méthode ouvre, par contre, des perspectives de conservation à plus long terme des potentialités instantanées des souches, aspect qui fera l'objet de développements ultérieurs.

	Eléments viraux			Virus non dégradés P_1+P_2	Virus totaux $P_0+P_1+P_2$
	P_0	P_1	P_2		
Mycélium essoré	100	100	100	100	100
Mycélium desséché	10	103	123	118	87

TABLEAU 10 : QUANTITES DE VIRUS PRODUITES DANS DEUX CONDITIONS DE CONSERVATION DU MYCELIUM (Souche 911)

(Exprimées en indices par rapport au témoin).

3.6. ESSAIS DE "GUERISON" DE SOUCHES VIROSEES PAR VOIES PHYSIQUE ET CHIMIQUE

Une autre possibilité de mesure de l'effet éventuel des PTV sur les caractères de *G. graminis* retenus dans cette étude, consiste à essayer de "guérir" un isolat virosé. Cette voie peut également permettre de disposer de souches réellement dépourvues de virus.

Deux types de traitements sont envisagés : par application de chocs thermiques ou par adjonction aux milieux de culture de substances empêchant ou limitant la réplication virale.

3.6.1. Traitements thermiques

Cette méthode qui fournit des résultats intéressants, exploités pour la sélection sanitaire chez les végétaux supérieurs, a été appliquée aux mycovirus dès leur découverte.

.../...

Ainsi, certains virus du champignon de couche sont éliminés si l'on place du mycélium dans une enceinte à température modérée (31 - 32°C) durant plusieurs semaines (GANDY et HOLLINGS, 1962). BANKS et al. (1968) aboutissent au même résultat en soumettant *Penicillium stoloniferum* à une température élevée (60 à 70°C) pendant une à quatre heures.

Citons aussi parmi de nombreux travaux ceux de WICKNER (1974) sur *Saccharomyces cerevisiae* et de LECOQ et FERAULT (1976) qui montrent une sensibilité différente des particules constituant le complexe présent chez *Piricularia oryzae* : les éléments de 25 nm sont éliminés lorsque le champignon est placé une heure à 65°C ; par contre, ceux de 38 nm ne semblent pas affectés par un traitement de trois heures à 68°C.

Chez *Gaeumannomyces graminis*, un essai est rapporté par RAWLINSON et al. (1973). Ces auteurs cultivent des isolats porteurs de PTV à 30°C pendant vingt-quatre jours, puis excisent des extrémités d'hyphes qui, après mise en culture, se révèlent saines.

De façon générale, les tentatives de thermothérapie se heurtent à la sensibilité des hôtes aux températures élevées ou moyennes, mais prolongées. Dans le cas de *G. graminis*, cette thermosensibilité est particulièrement élevée. TIVOLI (1976) souligne cette faible résistance : en soumettant, par trempage dans un bain-marie, des explantats mycéliens placés en tube dans une solution de malt à 2 p. 100, à des températures allant de 34 à 44°C pendant des durées variant de quinze minutes à seize heures, on constate que le niveau léthal est atteint à 43° quelle que soit la durée. A titre d'exemples, 40 et 42° sont supportés, mais pas au-delà d'une heure et une demi - heure respectivement ou 38° durant quatre heures.

Il semble y avoir homogénéité de réponse des souches testées (dont 911 et 911-1). Toutefois, la vitesse de reprise n'est pas la même, au bénéfice des agressives.

D'autre part, un essai préliminaire réalisé sur la souche 911 montre la forte résistance des virus à la dénaturation in vitro. Des fractions aliquotes d'extrait purifié sont placées dans un bain-marie thermostaté et demeurent dix minutes à la température désirée (ici 50 - 61 - 66 - 68 - 73 - 75 - 85 et 87°C). Après traitement, la fraction est refroidie, puis placée sur un gradient de sucrose dans les conditions présentées précédemment.

.../...

Chaque extrait est également analysé sérologiquement.

Il faut atteindre 85°C pour que la dénaturation soit importante et 87° pour que le phénomène soit total.

Ce résultat ne constitue cependant qu'un point de repère et pour plusieurs raisons :

- la dénaturation in vitro n'a qu'un lien éloigné avec ce qui se passe in vivo. Des preuves multiples en sont, en tout cas, fournies par des virus affectant des végétaux supérieurs (Fraisier et Canne à sucre, par exemple).

- la durée du traitement intervient et l'effet positif éventuel résulte du couple niveau thermique atteint-durée d'exposition (cité par GIBBS et HARRISON, 1976).

On se trouve cependant avec *G. graminis* dans un cas a priori particulier : le champignon ne supporte pas les températures élevées alors que les virus résistent (in vitro) jusqu'à des niveaux thermiques très importants.

La souche utilisée dans les expériences est la 911 et le processus est identique à celui développé au § 3.3. qui a permis de montrer que la production de virus demeure forte à 30°C :

- préculture en boîte de Petri (gélose-malt 2 p. 100), sept jours à 15°C,

- prélèvement d'explantats de 1 cm^2 au front de croissance,

- ensemencement de quatre fioles de Roux par cas (malt 2 p. 100, asparagine 2 p. 1000),

- début de culture à 20°C (quatre jours),

.../...

- exposition à la température et le temps désirés (le moment "zéro" est celui de l'obtention, au thermomètre immergé dans une fiole témoin, de la température choisie),

- compléments de culture à 20°C, la croissance s'effectuant durang vingt jours au total.

Les traitements éprouvés sont les suivants :

37°C une heure
38° trois heures
40° quarante-cinq minutes
40° une heure trente
42° une heure
43° trente minutes
30° quatre jours, puis 4° quatre jours et 20° neuf jours.

D'autres essais réalisés à des températures supérieures à 43°C, même pendant des temps courts (minimum : cinq minutes), ont entraîné la mort du champignon.

Le témoin est maintenu en permanence à 20°.

Les résultats obtenus figurent au tableau 11.

.../...

Traitements	Poids de mycélium essoré par fiole (moyenne de quatre)		Eléments viraux			Virus non dégradés	Virus totaux $P_0+P_1+P_2$
	g	indices	P_0	P_1	P_2		
37° 1 h	4,0	71	120	61	38	52	59
38° 3 h	3,3	59	181	48	16	35	51
40° 45 min	3,9	70	189	82	59	73	85
40° 1 h 30	2,8	50	159	131	27	90	97
42° 1 h	1,6	29	400	91	91	91	123
43° 30 min	1,6	29	474	137	77	113	151
30° 4 j - 20° 9 j - 4° 4 j	0,6	11	407	111	86	101	133
Témoin 20°	5,6	100	100	100	100	100	100

TABLEAU 11 : ESSAIS DE THERMOTHERAPIE DES PTV CONTENUES DANS LA SOUCHE 911 (résultats exprimés en indices par rapport au témoin maintenu à 20°C).

Plusieurs constatations peuvent être faites :

- l'application de chocs thermiques, brefs par rapport au temps total de culture, a un effet fortement dépressif sur la croissance du champignon. Le phénomène est particulièrement net aux températures les plus élevées et accentué dans le cas d'exposition longue à 30°C puis à 4°C.

- dans cette expérience, le champignon a supporté un traitement de trente minutes à 43°C, mais pas au-delà. On retrouve donc le seuil de destruction à 42-43°C.

.../...

- la réplication virale est stimulée après passage aux températures les plus élevées, de même que la dégradation des particules extraites.

Par contre, au niveau 37-38°C, la production de virus est nettement diminuée (jusqu'à 65 p. 100 pour les particules complètes).

Dans ces essais, la thermothérapie pratiquée sur des explantats mycéliens d'une souche agressive n'a pas permis d'éliminer les virus contenus, mais à montré l'effet important de l'application de tels chocs sur la croissance ultérieure du champignon et la production de PTV. Les résultats obtenus à 37-38°C laissent entrevoir des possibilités de guérison, peut-être par exposition prolongée ou chocs répétés à ces températures.

3.6.2. *Traitements chimiques*

Les inhibiteurs de virus d'animaux et de végétaux agissent sur une ou plusieurs étapes des mécanismes réplicatifs.

Parmi les substances utilisées, de nombreuses présentent une certaine spécificité d'action :

- inhibiteurs de transcription : rifampycine, actinomycine D (MARINO et al., 1968 ; LOCKHART et SEMANCIK, 1968),

- produits agissant sur le métabolisme protéique : chloramphénicol, cycloheximide (ALBOUY et LAPIERRE, 1968),

- matières actives au niveau de la synthèse des acides nucléiques : 2-thiouracile (JEENER et ROSSEELS, 1953).

L'effet d'autres substances est éprouvé sans que l'on en connaisse les sites d'action, notamment :

- des dérivés de l'isatine (THOMPSON, 1953 ; LAPIERRE et al., 1971 ; FOX et al., 1977),

- certains β-diketones (DIANA et al., 1977),

.../...

- la guanidine qui inhibe un certain nombre de virus à ARN avec pluralité d'actions selon les concentrations utilisées (VARMA, 1968 ; DAWSON, 1976).

De façon générale, ces traitements ont une action dépressive sur le métabolisme cellulaire.

Les premiers essais de "guérison" de champignons virosés ont été effectués, avec succès, chez *Penicillium chrysogenum* en utilisant notamment la 5-azacytidine, la cycloheximide et le bromhydrate d'éthidium (LEMKE et al., 1973).

Une autre possibilité consiste à éprouver l'action in vivo de toxines produites par des champignons,à l'égard des mycovirus ou de leurs ARN bicaténaires. Ainsi, l'acide mycophénolique, la patuline, la gliotoxine inhibent la réplication des virus associés à *Penicillium stoloniferum* (DETROY et WORDEN, 1978). Aucun travail de ce type n'ayant été réalisé chez *Gaeumannomyces graminis*, il nous a paru intéressant de tester l'effet de quelques substances.

Une première série d'expériences consiste à adjoindre au milieu de culture de la souche 911, différentes doses de deux produits montrant une action inhibitrice marquée vis-à-vis de la réplication de virus à ARN monocaténaire de végétaux supérieurs : le 2-thiouracile et la guanidine-HCl (références indiquées supra).

Dans un premier temps, il s'agit de déterminer l'effet éventuel de chacun sur la croissance du champignon en boîte de Petri : des doses de deux substances sont ajoutées au milieu gélosé encore liquide (+ 40°C environ), que l'on ensemence par un explantat mycélien quelques heures plus tard. La vitesse de croissance est mesurée par le rayon moyen des colonies au septième jour et comparée à celle de témoins ayant crû sur un milieu auquel on a ajouté de l'eau stérile en quantité comparable (deux répétitions par cas).

Le rapport des deux croissances indique le degré d'inhibition ou de stimulation.

Les résultats, rapportés par les tableaux 12 et 13, indiquent :

- dans le cas du 2-thiouracile, une inhibition maximum de 24 p. 100 et une stimulation extrême de 10 p. 100. Les variations étant désordonnées, on a arbitrairement décidé de tester l'efficacité des concentrations correspondant à ces deux cas (1000 et 1500 µl) ainsi que celui de 500 µl (la molarité utilisée -0,5mM- est due à la faible solubilité de ce composé),

- en ce qui concerne la guanidine-HCl, utilisée sur une plage beaucoup plus large en raison de sa solubilité, une inhibition maximum de 21 p. 100, une stimulation allant jusqu'à 19 p. 100 et des écarts entre les témoins de 8 p. 100.

Son influence sur le contenu viral est éprouvé dans quatre cas :

- 40 mM - 1000 µl (stimulation importante)
- 0,5 M - 200 µl (absence d'effet)
- 1 M - 1000 µl (inhibition maximum)
- 2 M - 1000 µl (concentration la plus élevée)

Les cultures sont effectuées en boîte de Petri contenant le produit, pendant sept jours, puis on prélève des explantats au front de croissance que l'on place en fioles de Roux (un explantat par fiole). Le contenu viral est analysé après seize jours de développement à 20°C et à l'obscurité.

Aux concentrations utilisées, l'effet du 2-thiouracile sur la synthèse virale mesurée par les quantités totales produites est faible, les résultats sont très homogènes. Par contre, au niveau des différents éléments viraux des différences sont observées : la dégradation est forte aux doses 500 et 1500 µl et la synthèse des grosses particules est très réduite dans les deux premiers cas.

.../...

Contrairement à ce qui est observé en boîte de Petri, le 2-thiouracile présente une action stimulante marquée sur la croissance du champignon (Tableau 14).

Doses en µl		50	100	250	500	750	1000	1250	1500
Vitesse de croissance [rayon moyen au 7ème jour]	Témoin	51							
	Traité	52	47	45	45	46	56	44	41
p. 100 d'inhibition ou de stimulation		2	9	13	13	11	10	16	24

TABLEAU 12 : EFFET DU 2-THIOURACILE 0,5 mM SUR LA CROISSANCE DU CHAMPIGNON

Traitements	Poids de mycélium essoré par fiole (moyenne de 4)		Eléments viraux			Virus non dégradés P_1+P_2	Virus totaux $P_0+P_1+P_2$
	g	Indices	P_0	P_1	P_2		
2-thiouracile 0,5 mM 500 µl	4	129	140	106	51	78	99
2-thiouracile 0,5 mM 1000 µl	3,8	123	108	133	58	95	100
2-thiouracile 0,5 mM 1500 µl	4,3	139	144	95	119	107	119
Témoin	3,1	100	100	100	100	100	100

TABLEAU 14 : EFFET DU 2-THIOURACILE SUR LA SOUCHE 911

Doses en µl		200						500					
Molarités		40 mM	60 mM	0,1 M	0,5 M	1 M	2 M	40 mM	60 mM	0,1 M	0,5 M	1 M	2 M
Vitesse de croissance [rayon moyen au 7ème jour]	Témoin	49						53					
	Traité	45	52	52	49	56	54	52	49	47	63	52	52
p. 100 d'inhibition ou de stimulation		9	6	6	-	14	10	2	8	13	19	2	2
		1000											
		40 mM	60 mM	0,1 M	0,5 M	1 M	2 M						
		51											
		56	52	48	56	42	56						
		10	2	6	10	21	10						

TABLEAU 13 : EFFET DE LA GUANIDINE - HCl SUR LA CROISSANCE DU CHAMPIGNON

La guanidine - HCl réprime fortement (jusqu'à 50 p. 100) la réplication virale, au moins la formation de particules complètes. Si l'on tient compte des virus dégradés, la production totale se situe à 60 p. 100 du témoin pour les doses 0,5 M - 200 µl et 1 M-1000 µl. Par contre, aux deux niveaux extrêmes, les quantités totales ne sont que légèrement modifiées.

Dans le cas de ce produit, on retrouve aussi un effet stimulateur marqué sur la croissance de la souche 911. Il peut être dû à la durée de la culture (20 jours au total au lieu de 7 jours en boîte de Petri) et/ou au milieu liquide utilisé (tableau 15).

Enfin, des tests d'agressivité réalisés à partir de prélèvements opérés avant extraction, montrent qu'aucune modification de ce caractère n'est entrainée par ces deux produits, quelle que soit la dose utilisée.

Traitements	Poids de mycélium essoré par fiole (moyenne de 4)		Eléments viraux			Virus non dégradés $P_1 + P_2$	Virus totaux $P_0 + P_1 = P_2$
	g	Indices	P_0	P_1	P_2		
Guanidine HCl 40 mM 1000 µl	3,1	100	173	104	35	69	104
Guanidine HCl 0,5 M 200 µl	4,1	132	70	35	80	57	62
Guanidine HCl 1 M 1000 µl	4,2	135	81	39	61	50	60
Guanidine HCl 2 M 1000 µl	4,3	139	201	72	96	84	123
Témoin	3,1	100	100	100	100	100	100

TABLEAU 15 : EFFET DE LA GUANIDINE HCl SUR LA SOUCHE 911

En résumé, les deux substances éprouvées vis-à-vis des virus contenus dans la souche 911 ont des incidences différentes : le 2-thiouracile paraît sans effet alors que la guanidine-HCl inhibe fortement la réplication à certaines concentrations.

Une telle action dépressive non linéaire de produits inhibiteurs a été relevée par LAPIERRE et al. (1971) dans le cas de virus de végétaux supérieurs. Il est également possible que la relation préalable recherchée entre concentration du produit et croissance du champignon n'ait pas de correspondance au plan des virus ; l'effet serait à rechercher au niveau d'un "seuil". Par ailleurs, la souche 911 est typiquement hypoagressive et la présence de virus a été démontrée depuis longtemps (LAPIERRE et al., 1970).

Ne devrait-on pas plutôt utiliser pour de tels essais des souches agressives chez lesquelles la présence de particules n'a pas été montrée, ou au contraire prouvée, mais peu de temps après leur isolement ?

Dans le premier cas, le but serait de conserver ces isolats à l'état "sain" ; dans le second, d'obtenir une "guérison".

Un essai de ce type est réalisé avec la souche 79-35-3, très agressive (A1) et qui contenait des virus trois mois après son isolement (deux types de particules).

Le produit utilisé est le bromhydrate d'éthidium (B.E.), inhibiteur de réplication des ARN, plus particulièrement des ARN bicaténaires, et dont l'activité a été signalée vis-à-vis des virus de *Penicillium stoloniferum* par LAPIERRE et al. (1971).

Une manipulation préalable a consisté à définir la tolérance in vitro de *G. graminis* en ajoutant, au milieu de culture gélosé, 1, 2, 5, 10, 20, 30 et 50 ppm de bromhydrate d'éthidium : l'extension du mycélium diminue avec l'augmentation de la concentration et la croissance devient nulle à partir de 30 ppm. Une autre conséquence de l'adjonction du B.E. au milieu est la formation plus fréquente de secteurs par le champignon.

.../...

Ceux-ci sont d'aspect homogène mais de coloration presque noire tranchant nettement sur les zones voisines gris clair. Cette observation, à rapprocher de celle faite par LEMAIRE et al. (1970) et qui avait permis la première mise en évidence de PTV chez ce champignon, nous a conduit à rechercher ces éléments à partir de cultures provenant de zones d'aspect normal, mais également de secteurs, selon le schéma suivant :

ensemencement en boîte de Petri, malt 2 p. 100 gélosé, B.E. 5 ppm

Développement mycélien
7 jours, 23° C, obscurité

Aspect normal — Secteur

prélèvement d'explantats
aux fronts de croissance

Transfert en fiole de Roux
(un explantat par fiole)

Culture sur milieu malt 2 p. 100

4 semaines
23°C
Obscurité

Malt seul — + B.E. 20 ppm — Malt seul — + B.E. 20 ppm

Analyse des caractères de croissance et d'agressivité et du contenu en virus

Le témoin est constitué par une culture de la souche 79-35-3 réalisée sans les mêmes conditions, les milieux ne contenant pas de B.E.

.../...

Traitements		Poids de mycélium essoré par fiole (moyenne de 4)		Agressivité	Eléments viraux			Virus non dégradés	Virus totaux
		g	Indices		P_0	P_1	P_2	$P_1 + P_2$	$P_0 + P_1 + P_2$
Culture d'aspect normal	B.E.5 ppm	5,1	104	A1	190	208	19	98	119
	B.E.5. puis 20 ppm	3,2	65	A1	776	243	102	161	293
Culture issue de secteur	B.E.5 ppm	3,7	76	A1	42	31	31	31	33
	B.E.5 puis 20 ppm	3,0	61	A1	421	137	130	134	195
Témoin (souche)		4,9	100	A1	100	100	100	100	100

TABLEAU 16 : EFFET DU BROMHYDRATE D'ETHIDIUM SUR LA SOUCHE 79-35-3

Les résultats rapportés au tableau 16 montrent une nette réduction de croissance appréciée par le poids de mycélium produit dans trois cas sur quatre, mais aucune modification du niveau d'agressivité. Les effets sur les PTV sont variables : pour les virus complets, une très forte inhibition (près de 70 p. 100) est observée dans le cas, issu de secteur et cultivé sept jours en présence de B.E. à 5 ppm. Pour les autres traitements, il y a stimulation allant jusqu'à 200 p. 100. Ce dernier résultat est principalement dû à une très forte dégradation des particules (jusqu'à près de huit fois la valeur du témoin), mais aussi à une concentration importante en virus de 26 nm.

L'action du bromhydrate d'éthidium se manifeste donc de façon variable sur la souche 79-35-3, selon les traitements. Un effet très dépressif sur les différents éléments viraux est obtenu dans un cas qui ne correspond pas à la dose la plus élevée. On retrouve peut-être là, la notion de "seuil" ou de "choc" à appliquer pour obtenir un résultat.

Au total, ces essais de chimiothérapie, qui n'ont pas abouti à une "guérison" des souches utilisées, laissent cependant entrevoir des possibilités. L'effet sur la croissance est souvent marqué, celui sur l'agressivité est nul et l'incidence sur la production de virus peut être importante : jusqu'à 40-50 p. 100 avec la guanidine et 70 p. 100 avec le bromhydrate d'éthidium. Ces cas d'inhibition ne sont pas reliés à l'évolution des concentrations des produits.

Les essais d'élimination des PTV par voies physique et chimique conduisent à des résultats positifs ponctuels : des niveaux thermiques et certaines concentrations de substances se montrent nettement inhibiteurs.

Deux voies paraissent intéressantes pour la poursuite éventuelle de ce travail.

La première consiste à conjuguer sur une souche virosée les effets des traitements thermiques à ceux de produits inhibiteurs ou encore à utiliser en complément la technique de section d'apex d'hyphes qui avait permis à RAWLINSON et al. (1973) d'obtenir des clônes sans virus.

La seconde vise au maintien de souches à l'état "sain" par des interventions de ces différents types.

-:-:-:-:-:-:-:-:-:-:-:-:-:-:-:-:-

3.7. MISE EN EVIDENCE DE PARTICULES VIRALES CHEZ *PHIALOPHORA RADICICOLA* ET ETUDE DE LEURS RELATIONS AVEC LES ELEMENTS VIRAUX CONTENUS DANS *G. GRAMINIS*

On sait que (cf. § 1.1) *Phialophora radicicola* Cain est considéré par des auteurs comme la forme imparfaite de *G. graminis* et que certains de ses isolats, lorsqu'ils sont présents sur les racines de céréales, limitent l'incidence du Piétin-échaudage. (BALIS, 1970 ; SCOTT, 1970).

Pour NOVOTNY (1979), la protection croisée conférée par ces champignons "analogues" repose sur des interactions qu'il observe *in vitro* : *Phialophora sp.* limite l'extension de *G. graminis*.

Récemment, WONG et SOUTHWELL (1980) et WONG (1981) indiquent une efficacité importante de *P. radicicola* var. *radicicola* (ainsi que de *G. graminis* var. *graminis*) vis-à-vis du Piétin-échaudage, alors que la variété *graminicola* ne confère aucune protection.

Ce sont RAWLINSON et MUTHYALU (1975 et 1976) qui découvrent les premiers des virus dans des isolats de *Phialophora* à hyphopodes lobés (h.l.) et montrent l'existence de relations sérologiques avec un extrait de *G. graminis* var. *tritici* (et l'antiserum correspondant).

Mac GINTY et al. (1981) entreprennent une étude plus systématique : l'examen en microscopie électronique du contenu de sept isolats de *Phialophora* indique qu'ils sont tous virosés,mais diversement. En effet, six isolats de *Phialophora* à h.l. renferment des PTV de 35 nm et deux contiennent en plus des virus de 40 nm. L'unique isolat de *P. graminicola* éprouvé présente des éléments de 30 nm.

Les caractérisations des ARNbc préparés à partir, soit du mycélium, soit d'extraits purifiés de PTV aboutissent aux mêmes résultats : les isolats renferment de un à cinq composants (avec des poids moléculaires compris

entre 1 et 6 x 10^6 daltons) et deux seulement présentent la même composition. Rappelons qu'un phénomène analogue est constaté chez *G. graminis* var. *tritici* (cf. § 1.3.).

Ces auteurs émettent - avec prudence - l'hypothèse que ces ARNbc jouent un rôle dans l'aptitude à la protection croisée des racines de céréales, à l'égard du Piétin-échaudage.

A partir de ces résultats, RAWLINSON et BUCK (1981) pensent à l'existence d'ARNbc satellites codant pour la synthèse d'une toxine protéique selon un schéma déjà envisagé pour *G. graminis* var. *tritici* (cf. § 1.3.).

Notre travail concernant les PTV associées à *Phialophora*, effectué à partir de 1980, a trois optiques :

- rechercher, selon nos méthodes, des PTV et les comparer physiquement et sérologiquement à celles rencontrées chez *G. graminis* var. *tritici*,

- apporter, au cas de relations, voire d'identité entre les PTV associées à ces deux champignons, un caractère taxonomique original,

- tenter des transmissions virales réciproques.

Ces deux derniers points sont d'intérêt quand on connaît la grande spécificité des mycovirus. En effet, le seul exemple contraire est celui d'un virus de *Penicillium brevicompactum* relié sérologiquement et présentant des propriétés biophysiques similaires au virus de *Penicillium chrysogenum* (WOOD et al., 1971, cité par SAKSENA et LEMKE, 1978).

Dans un premier temps, des PTV sont recherchées dans des isolats de *Phialophora radicicola* (*) provenant de Blé, Maïs et Millet, conservés à la Station de Pathologie végétale, INRA de Rennes, mais dont la position systématique n'a pu être précisément établie.

(*) Une mise au point taxonomique est nécessaire. Nous l'empruntons à WALKER (1981) qui vient de faire la synthèse d'une synonymie et de difficultés systématiques entretenues pendant plusieurs dizaines d'années.

Il est conseillé maintenant :

- d'utiliser *P. radicicola* var. *radicicola* (ou encore *Phyalophora sp.* !) pour les isolats à hyphopodes lobés, qui sont, peut-être, l'état végétatif de *G. graminis* var. *graminis*.

- de constituer la variété *graminicola*, non pathogène, en espèce : *P. graminicola*.

.../...

Après croissance du champignon puis purification selon le même schéma que pour *G. graminis*, les profils obtenus en gradient de saccharose sont du même type (cf § 2.2.1). Deux particules, d'environ 26 et 35 nm également, sont observées en microscopie électronique. L'épreuve sérologique contre le sérum anti-911 (figure 8), indique une homologie totale entre les virus de 26 nm des deux champignons (au moins avec les isolats provenant de Blé et de Maïs, l'origine Millet ne fournissant pas de réaction et présentant en gradient une faible concentration virale). Une ligne protéines normales est commune.

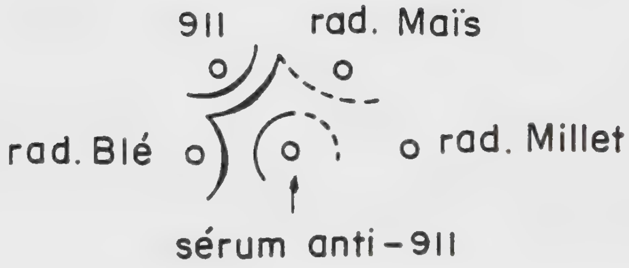


Figure 8 : Réactions sérologiques observées en immunodiffusion en milieu gélosé entre un extrait de la souche 911 de *G. graminis* son antisérum et des extraits de *P. radicicola*.

Un second essai, ayant les mêmes buts, est réalisé à partir de six isolats provenant également de la mycothèque de la Station de Rennes mais dont la détermination, l'origine et la date d'isolement sont précises :

1 - *Phialophora radicicola* var. *graminicola (P. graminicola)*,
Mons-en-Chaussée, 1977.

2 - *Phialophora radicicola* var. *graminicola (P. graminicola)*,
Mons-en-Chaussée, 1978.

3 - *Phialophora radicicola* var. *radicicola*, St-Martin-de-Hinx 1977.

4 - *Phialophora radicicola* var. *radicicola*, St-Martin-de-Hinx 1978.

5 - *Phialophora radicicola* var. *radicicola*, Castelnaudary, 1977.

6 - *Phialophora radicicola* var. *radicicola*, La Gurtade, 1981.

Les résultats physiques obtenus sont du même type pour les six souches: présence de 2 ou 3 maxima d'absorption après gradient, aux mêmes niveaux que précédemment et observation en microscopie électronique de particules des deux tailles, mais en faibles quantités chez *radicicola*. Par contre, en sérologie, seuls les deux isolats *graminicola* réagissent par une ligne homologue à celle du virus de 26 nm de *G. graminis*. Aucune réaction n'a lieu avec les quatre isolats *radicicola* (figure 9).

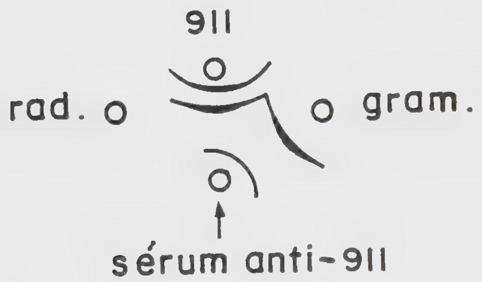


Figure 9 : Réactions sérologiques observées en immunodiffusion en milieu gélosé entre un extrait de la souche 911 de *G. graminis*, son antisérum et des extraits de *P. radicicola* var *graminicola* (2) et de *P. radicicola* var *radicicola* (4).

Compte tenu de ces résultats, il était nécessaire de réaliser des antisera à partir de préparations purifiées de PTV de *Phialophora*.

Notre choix s'est porté sur les isolats.

- *Phialophora radicicola* var. *graminicola* n° 2 (Mons-en-Chaussée, 1978).

- *Phialophora radicicola* var. *radicicola* n° 4 (St-Martin-de-Hinx, 1978).

qui fournissaient, pour chacune des variétés, les concentrations virales les plus fortes.

Six injections sont réalisées par voie intramusculaire ; elles sont composées par moitié d'adjuvant incomplet de Freund et espacées d'une dizaine de jours. La récupération du sang des lapins à lieu huit jours après la dernière injection.

Les réactions obtenues, observées en immunodiffusion en gélose, sont les suivantes :

- pour le sérum anti-*graminicola*, deux lignes anti-virus apparaissent avec l'extrait homologue et une seule avec *G. graminis* souche 911. Il y a raccordement total entre les deux lignes communes ce qui indique une homologie des antigènes, déjà observée avec le sérum anti-souche 911. Aucune réaction virale n'apparaît avec l'extrait *radicicola*. Une ligne protéine normales est homologue pour les trois antigènes.

- pour le sérum anti-*radicicola*, aucune réaction anti-virus n'est observée. Une ligne protéines normales se forme avec l'antigène homologue (figure 10).

.../...

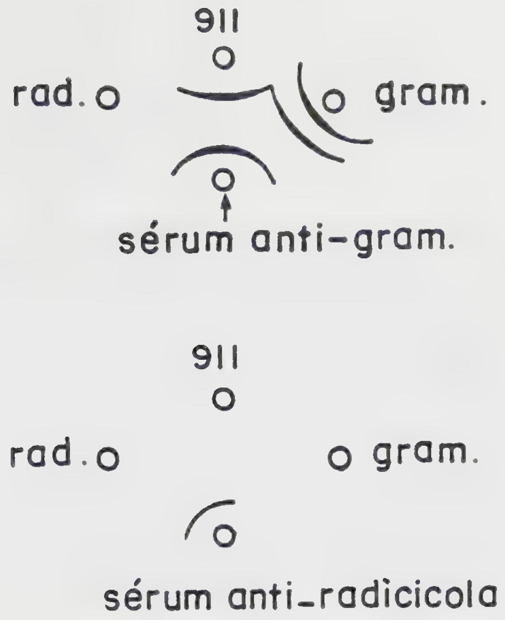


Figure 10 : Réactions sérologiques observées en immunodiffusion en milieu gélosé entre deux extraits de *Phialophora*, les antisera homologues et un extrait de la souche 911 de *G. graminis*.

En résumé, on note une homologie sérologique croisée entre les particules de 26 nm de *G. graminis* et de *Phialophora radicicola* var *graminicola*.

L'absence de réactions anti-virales pour la variété *radicicola* est probablement due à une trop faible concentration virale que la technique d'immunodiffusion ne permet pas de mettre en évidence (cf. chapitre 4).

Des transmissions réciproques des virus sont tentées par voie directe entre les trois espèces de champignons. La méthode utilisée est celle indiquée au § 3-4 pour les essais de transmission entre des isolats de Piétin-échaudage et qui permet une régénération satisfaisante des protoplastes. Par contre, et malgré plusieurs essais, cette méthode pratiquée sur les isolats 2 et 4 de *Phialophora* n'aboutit à aucune régénération.

On s'est donc limité à une tentative de transmission des virus de *Phialophora* à *G. graminis*.

Une seule différence importante consiste en l'addition de polyornithine à la solution virale,avant le mélange aux protoplastes. Les doses utilisées s'inspirent de travaux (CABOCHE et MAURY, communication personnelle) effectués sur la Mosaïque du Tabac afin de faciliter son absorption : 1,5 et 20 µg/ml de solution virale. Le contact a lieu pendant 30 minutes et la concentration finale en protoplastes est de l'ordre de 1,5 x 10^6/ml. On étale 0,01 ml par boîte de Pétri. Après régénération, huit origines *graminicola* et sept *radicicola* sont repiquées en tube, puis en fioles de Roux.

L'analyse en gradient et l'épreuve sérologique, pratiquées à partir des quinze extraits obtenus, ne montrent aucune différence : seuls les virus de *G. graminis* sont présents.

Au total, des PTV de 26 et 35 nm environ sont détectées à partir des neuf isolats de *Phialophora* étudiés. Il existe chez la variété *graminicola* et *G. graminis* var. *tritici* un virus sérologiquement commun (dont la caractérisation physique est poursuivie) alors que les seules références sur ce sujet (RAWLINSON et MUTHYALU, 1975 et 1976) avaient trait à la variété *radicicola* et que les "relations" indiquées étaient peu précisées.

S'agit-il d'un second exemple de virus commun à deux champignons différents ou bien d'un caractère supplémentaire d'identité ou de grande proximité entre les deux espèces ?

-:-:-:-:-:-:-:-:-:-:-:-:-:-:-

4 - DISCUSSION CONCLUSIVE

Nos résultats peuvent être rappelés brièvement en sept points :

- une certaine relation semble exister entre les caractères de croissance, agressivité et fructification sexuée du champignon et son contenu en virus. Les souches de croissance normale, agressives, contiennent ou non des PTV. Celles qui ne produisent plus de périthèces en renferment. Les souches de croissance réduite, hypoagressives et incapables de fructifier sont virosées,

- l'étude de l'évolution comparée *in vitro* de ces caractères et du contenu viral de souches mycéliennes, à l'origine agressives et dépourvues de PTV, montre, qu'avec le temps, les virus "apparaissent" successivement dansle champignon dont la croissance et l'agressivité diminuent et qui perd sa capacité à la reproduction sexuée. La concentration virale s'accroît durant cette période,

- les isolats ascosporés obtenus à partir de souches mycéliennes saines ou virosées, renferment le plus souvent des virus. L'agressivité de ces isolats est élevée (de type A1) ; la présence des virus est donc bien compatible avec cet état,

- les essais d'infection directe de protoplastes d'un isolat "sans virus" du champignon n'ont pas abouti qui entraînent une dérépression de la réplication virale soulignant le caractère probablement latent de ces éléments,

- la "liaison" entre le champignon et les PTV paraît forte : la production de virus varie en fonction des conditions de milieu, mais les particules demeurent présentes. Des tentatives de "guérison" d'isolats virosés par voies physique et chimique indiquent que l'application de chocs thermiques vers + 37°C ou l'addition de guanidine ou de bromhydrate d'éthidium

.../...

au milieu de culture réduisent de façon marquée les quantités de virus présentes mais que ces effets sur la réplication virale cessent dès la suppression de leurs causes,

- la recherche de PTV chez des isolats de *Phialophora radicicola* var. *radicicola* et de *Phialophora graminicola*, prélevés au contact d'hôtes variés (Blé, Maïs, Millet), aboutit à la mise en évidence systématique d'éléments de deux tailles (26 et 35 nm). Les petites particules sont sérologiquement homologues pour *P. graminicola* et *G. graminis* var *tritici* mais celles contenues dans la variété *radicicola* ne sont pas reliées. Il s'agit d'un second exemple de virus commun - au moins selon le critère sérologique - à deux champignons. Mais ce résultat constitue peut-être une preuve supplémentaire de leurs relations,

- des essais de transmission réciproque des virus hétérologues, en présence de polyornithine, se sont heurtés à des difficultés de régénération des protoplastes de *Phialophora*. L'analyse du contenu viral de cultures issues de protoplastes de *G. graminis* ayant été au contact des PTV de *P. graminicola* et *P. radicicola* n'a pas permis la mise en évidence de ces derniers éléments.

D'autre part, il est utile de mentionner d'autres résultats, ponctuels, qui n'ont pas été développés ici car ils constituent, soit des voies de recherche non choisies dans notre démarche, soit des compléments ou des adaptations de travaux indiqués par la littérature :

- la recherche de plasmides de type bactérien selon la méthode de CASSE et al. (1979) chez des souches agressives (78-28, 79-17-1, 79-35-1, 79-35-21) et hypoagressives (612, 911, 911-1, 6-7-1) n'a conduit à aucune découverte,

.../...

- des ARN bicaténaires peuvent être mis en évidence sérologiquement à partir d'extraits des différents niveaux d'agressivité,

- la technique immunoenzymatique ELISA, qui devrait permettre la détection de très faibles quantités virales, a été éprouvée avec le sérum préparé à partir de la souche 911, mais l'absorption des constituants normaux du champignon - phénomène fréquent en mycovirologie - rend son utilisation, pour l'instant, impossible,

- les relations des virus contenus dans le champignon avec l'hôte Blé, placé dans différentes conditions de milieu, sont difficiles à appréhender. Les essais réalisés jusqu'à maintenant se heurent au problème de la conservation à l'état "sain" des souches, au moins pendant quelques mois,

- les tentatives de localisation en microscopie électronique, des virus contenus dans les hyphes de *G. graminis* aboutissent à une mise en évidence irrégulière d'une faible quantité de particules. Les résultats de ce travail entrepris avec Madame MICHON (INRA-Versailles) rejoignent partiellement ceux de ALBOUY (1978) qui note la difficulté d'observation des virus dans les hyphes jeunes.

Plusieurs preuves du caractère "latent" des PTV sont contenues dans nos résultats :

- l'évolution de la souche mycélienne d'origine intraracinaire 711 et de l'isolat ascosporé 911-1 vont dans le même sens. On constate d'abord un état "sain", puis les virus sont détectés,

- les isolats ascosporés de la souche mycélienne 79-17-1, pourtant dépourvue de PTV, sont virosés peu après leur obtention,

- les essais de transmission des virus à une souche saine,en utilisant des protoplastes, révèlent la présence de particules dans les cultures régénérées à partir des témoins.

On constate donc plusieurs différences importantes avec les résultats fournis par d'autres auteurs :

- une certaine relation existe entre la réduction du niveau d'agressivité du champignon et, au moins, sa concentration en virus,

- les caractères du champignon et le contenu en virus évoluent *in vitro* : la croissance et l'agressivité diminuent, l'aptitude à la reproduction sexuée disparaît,alors que les virus sont mis en évidence successivement et que leur concentration s'accroît,

- la reproduction sexuée de souches virosées permet la restauration d'un niveau élevé d'agressivité (A1) et le maintien des PTV,

- des sérotypes distincts ne semblent pas exister.

Soulignons par ailleurs que les travaux publiés sur le sujet depuis 1980 n'émanent plus guère que des équipes anglaises (BUCK et RAWLINSON) et ils ont trait essentiellement à la caractérisation approfondie des PTV et ARNbc et donc,relèvent moins directement de la démarche mycovirologique.

Plusieurs hypothèses peuvent être formulées pour expliquer la mise en évidence variable des PTV chez *G. graminis* :

- les virus sont présents dans toutes les souches du champignon, mais sous forme non encapsidée ou en très faibles quantités. Sous l'action de facteur(s) du milieu ou intracellulaire(s), la formation de virions complets et/ou la synthèse importante de particules interviendraient,

- les virus ne sont présents que dans quelques hyphes mycéliennes des souches récemment isolées et "contaminent" progressivement les zones qui en sont dépourvues,

- la modification de caractères du champignon dépend de l'un seulement ou de formes particulières des virus ou encore de leur concentration.

Au total, si l'on compare le modèle "virus associés à *G. graminis*" aux autres systèmes de mycovirus, on ne trouve guère de ressemblances qu'avec celui des particules présentes chez *Helminthosporium victoriae* : dans ce cas, la présence de l'une des particules est accompagnée de modifications morphologiques du champignon dont l'intensité est reliée à leur concentration (SANDERLIN et al., 1978 ; GHABRIAL et al., 1979). Ces auteurs indiquent avoir réussi la transmission des deux types de particules, en utilisant des protoplastes d'isolats qui en étaient dépourvus, mais à un taux faible (GHABRIAL, 1980).

La confrontation de tous ces résultats indique la faiblesse des relations prouvées entre caractères du champignon - notamment les éléments de sa pathogénie - et contenu en particules de type viral. Il reste néanmoins certains constats dont le principal est celui de l'évolution parallèle entre réduction de l'agressivité et quantité croissante de virus.

Plusieurs questions importantes qui intéressent principalement les relations champignon-virus *in situ* n'ont pas encore trouvé réponses et feront, sans doute, l'objet de développements :

- quelle est l'importance réelle de la dissémination des PTV par ascospores ?

- la possession de certains composants nucléïques confère-t-elle au champignon des "avantages" durant sa phase parasitaire ?

- l'accroissement des quantités de virus contenues dans les isolats au cours d'une culture continue de céréales et la réduction en cas de rupture, impliquent-elles un effet négatif des PTV (ou de certains types) sur le développement saprophytique du champignon en conditions naturelles ?

- les liaisons PTV - champignon peuvent-elles être rompues de façon <u>durable</u> et avec quel(s) effet(s) pour l'isolat "guéri" ?

Au total, le "modèle" *G. graminis* - PTV associées, assez bien connu maintenant au plan des virus et ARN bicaténaires, ne peut plus guère constituer l'une des références importantes de la mycovirologie à objectif agronomique. Il offre par contre de vastes perspectives de recherches plus fondamentales. En conséquence, d'autres approches du déterminisme des modifications du pouvoir pathogène de ce champignon sont à développer et en premier lieu un sérieux approfondissement des connaissances de ses caractères génétiques apparaît très nécessaire.

-:-:-:-:-:-:-:-:-:-:-

CONDENSE

Les particules de type viral associées à *Gaeumannomyces graminis* (Sacc.) Arx et Olivier sont-elles responsables de modifications du pouvoir pathogène du champignon ?

La maladie du Piétin-échaudage des céréales à paille est provoquée par le Champignon *Gaeumannomyces graminis* (Sacc.) Arx et Olivier (Ascomycètes - Ascohyméniaux - Diaporthales) dont on connaît différentes variétés. Les travaux réalisés dans cette étude, ont porté surtout sur la forme *tritici*, mondialement répandue et affectant la plupart des céréales ("Take-all" des auteurs anglo-saxons).

G. graminis présente une vie saprophytique et un développement parasitaire. Il se conserve dans le sol - peu de temps - sur des fragments de végétaux, puis se fixe au niveau des poils absorbants des plantes sensibles et envahit plus ou moins le système racinaire et, parfois, la base des tiges.

Ce type d'infection perturbe la translocation de l'eau et des produits du métabolisme dans la plante.

Les dégâts sont très variables selon le moment des attaques, leur extension et la taille des foyers : destruction prématurée des plantes, tallage réduit, échaudage. Les pertes peuvent atteindre 60 à 80 p.100 dans des cas extrêmes avec destruction des racines coronaires.

Le Piétin-échaudage est caractérisé par une évolution particulière au cours des années. Le phénomène est connu sous le nom de <u>déclin</u> ("Take-all decline") : en cas de culture continue de céréales, on note d'abord une augmentation des attaques jusqu'à un stade très grave qui se situe entre la seconde et la quatrième année de culture. Puis, la maladie diminue d'intensité pour se situer en deçà d'un seuil de nuisibilité. L'interruption de la monoculture entraîne unr rupture de cette évolution qui s'exprime de façon variable en intensité et durée selon la plante utilisée.

.../...

Différentes hypothèses, présentant peut-être certaines complémentarités, sont avancées pour expliquer le phénomène :

- apparition d'une microflore antagoniste,
- intervention de facteurs nutritionnels,
- modification des souches.

En effet, l'isolement des souches du champignon présentes dans un sol portant une culture continue de céréale, permet d'observer que leurs caractères ne sont pas les mêmes aux différents moments de l'évolution de la maladie. En phase d'accroissement, les souches ont un pouvoir pathogène élevé, colonisent la base des gaines foliaires et produisent abondamment des périthèces. En phase de déclin, par contre, elles ne provoquent que très peu de dégâts et ne fructifient pas.

Au plan des méthodes de lutte, les caractères de la maladie rendent inefficace toute application de produits chimiques. Par ailleurs, la résistance génétique n'offre guère de possibilités pour l'instant. Il faut donc recourir à d'autres méthodes culturales (rotations, fertilisation, techniques de semis) et biologiques.

Différents procédés de lutte biologique offrent de sérieuses perspectives par :

- modification des biocénoses du sol,
- stimulation des phénomènes de compétition,
- utilisation des souches hypoagressives qui repose sur la prémunition de la céréale et la contagion de l'hypoagressivité. Cette voie, mise au point par la Station de Pathologie végétale INRA de Rennes, qui a fait l'objet de très nombreuses expérimentations, est utilisable au champ par enrobage des semences avec une souche hypoagressive.

La recherche de la (ou des) cause(s) de ce caractère d'hypoagressivité, stable *in vitro*, a suscité de nombreux travaux.

.../...

Une des hypothèses émises pour expliquer ce phénomène repose sur la modification des souches présentes du parasite, par acquisition de particules de type viral (P.T.V.).

La découverte de virus chez *G. graminis* remonte à une douzaine d'années (LAPIERRE et al., 1970 ; LEMAIRE et al., 1970). A cette époque, des éléments viraux avaient été observés chez le champignon de couche et quelques champignons microscopiques. Les relations présumées entre l'hôte et le parasite impliquaient, dans l'esprit des chercheurs, l'existence de possibilités de réduction du pouvoir pathogène des champignons affectant les végétaux, par utilisation de ces mycovirus.

Depuis, des particules ont été découvertes chez une centaine de champignons appartenant aux différents groupes de la classification. Ces virus, pour la majorité à symétrie cubique et acide ribonucléique bicaténaire, ne peuvent actuellement être considérés comme infectieux en raison de l'impossibilité dans laquelle se trouvent les équipes de les transmettre. Leur transfert est toutefois signalé dans certains cas par anastomose hyphale ou fusion de protoplastes. Au plan des relations avec leurs hôtes, on demeure encore dans une grande ignorance.

Dans le cas de *G. graminis,* les résultats fournis dans ce dernier secteur par les différentes équipes française, puis anglaise, américaine et belge étant contradictoires, les laboratoires de Pathologie végétale à l'INRA de Rennes et de Versailles ont décidé en 1977 de concentrer leurs efforts sur ce sujet qui paraissait, alors, encore prometteur de perspectives dans le domaine des relations entre pouvoir pathogène et présence de virus.

Cette étude s'est située dans le cadre de la confrontation des caractères de souches du champignon et de leur contenu viral, ces deux aspects étant replacés dans leur dynamique. Il s'agit, à proprement parler, d'un travail de mycovirologie, qui apporte des éléments de réponse aux questions suivantes :

.../...

- Existe-t-il des relations, à un moment donné de leur évolution entre certains caractères biologiques des souches du champignon et leur contenu viral ?

- Ces caractères et le contenu viral évoluent-ils lors de la conservation *in vitro* du champignon ?

- Quel est le devenir des particules virales au moment de la fructification sexuée de *G. graminis* ?

- Les conditions de milieu ont-elles une influence sur les rapports champignon-virus ?

- Afin de mieux analyser les effets des virus sur la biologie de l'hôte, peut-on transmettre directement les PTV à une souche qui en est dépourvue et "guérir" une souche virosée ?

- Existe-t-il des PTV chez *Phialophora radicicola* CAIN, forme végétative de *G. graminis* pour certains auteurs, et quelles relations y-a-t-il entre les virus associés à ces deux champignons ? Peut-on réaliser des transmissions réciproques de virus hétérologues ?

Les principaux résultats obtenus peuvent être résumés de la façon suivante :

L'étude de certains aspects de la biologie du champignon (croissance, agressivité et fructification sexuée) et l'analyse du contenu viral de dix-huit souches d'origine mycélienne intraracinaire montrent que les souches hypoagressives ou agressives, mais ayant perdu leur aptitude à la reproduction sexuée contiennent deux types de PTV (de 26 et 35 nm). Par contre, les souches agressives formant des périthèces contiennent ou non des virus.

L'évaluation périodique des caractères biologiques et du contenu en virus d'une souche mycélienne conservée *in vitro* indique qu'en dix-sept mois, l'agressivité du champignon diminue allant d'un niveau élevé jusqu'à l'hypoagressivité et passant par un état intermédiaire caractérisé par une

.../...

perte de capacité à la reproduction sexuée. Dépourvue de particules virales après son isolement, la souche contient ensuite un virus, puis deux. L'apparition successive des virus accompagne, en la devançant, la réduction du niveau d'agressivité.

L'état virosé de la plupart des isolats monoascosporés, obtenus à partir de souches agressives,virosées ou non, est compatible avec un degré d'agressivité élevé.

Des essais d'infection directe de protoplastes de champignon, d'une souche sans virus, entraînent une dérépression de la réplication virale qui souligne le caractère probablement latent de ces éléments.

La synthèse virale dépend fortement des conditions de culture du champignon (durée, température et lumière). Par contre, les différentes formes de conservation du mycélium ont peu d'influence sur les quantités de virus contenues.

Des tentatives de "guérison" d'isolats virosés par voies physique et chimique indiquent que l'application de chocs thermiques vers + 37°C ou l'addition de guanidine ou de bromhydrate d'éthidium au milieu de culture réduisent notablement la production de virus. Dans tous ces essais de thermothérapie et chimiothérapie, les effets positifs ponctuels observés sur la synthèse virale cessent avec la suppression de leurs causes.

La recherche de PTV chez des isolats de *Phialophora radicicola* variétés *graminicola* et *radicicola* obtenus à partir d'hôtes varies (Blé, Maïs, Millet) a abouti à la mise en évidence dans tous les cas d'éléments de deux tailles (26 et 35 nm). Il s'est avéré que les particules de plus faible diamètre sont sérologiquement homologues pour la variété *graminicola* et *G. graminis* et qu'il n'en est pas de même avec la variété *radicicola*. Or, mis à part chez *Penicillium*, la spécificité des PTV associées à des champignons est grande. Ce résultat peut constituer un nouvel élément de preuve des relations entre les deux champignons.

Des essais de transmission réciproque des deux complexes viraux par voie directe, en présence de polyornithine, se sont heurtés à des difficultés de régénération des protoplastes de *P. radicicola*. L'analyse du contenu viral des cultures issues des protoplastes de *G. graminis* ayant été en contact avec les PTV de *P. radicicola* n'a pas permis de mettre en évidence ces derniers éléments.

Parallèlement à ces travaux, des résultats importants ont été obtenus par d'autres équipes ces dernières années :

- FRICK et LISTER (1978) ont montré l'existence de groupes d'isolats du point de vue sérologique et proposé l'existence de liaisons entre pouvoir pathogène, sérotype et PTV.

- Les Anglais ALMOND, BUCK, MUTHYALU, RAWLINSON et ROMANOS (1976, 1977, 1978 et 1981) indiquent l'existence d'un troisième type de PTV (de 40 nm) et de relations sérologiques entre des extraits du champignon provenant de différents continents. Ces auteurs ont par ailleurs analysé de façon approfondie la composition en ARN bicaténaires (ds RNA) d'un certain nombre d'isolats et abouti à la conclusion que le nombre de composants varie largement (de 1 à 10) et que leur distribution est originale pour chaque isolat. Ils ont en outre prouvé l'existence d'ARN bicaténaires satellites chez quelques isolats et de relations sérologiques entre les PTV isolées de *Phialophora spp.* et des variétés *graminis* et *tritici* de *G. graminis*.

Aucun laboratoire n'a réussi la transmission directe au champignon des PTV préparées *in vitro*.

La confrontation de tous ces résultats indique la faiblesse des relations prouvées entre caractères du champignon - notamment les éléments de sa pathogénie - et contenu en particules de type viral. Il reste néanmoins certains constats dont le principal est celui de l'évolution parallèle entre réduction de l'agressivité et quantité croissante de virus.

Comme la plupart des mycovirus à ARN bicaténaire, les PTV associées à *G. graminis* présentent plusieurs caractères qui les font donc paraître latentes ou avirulentes.

.../...

Néanmoins plusieurs questions importantes n'ont pas encore trouvé réponses :

- quelle est l'importance réelle de la dissémination des PTV par ascospores ?

- la possession de certains composants nucléīques confère-t-elle au champignon des "avantages" durant sa phase parasitaire ?

- l'accroissement des quantités de virus contenues dans les isolats au cours d'une culture continue de céréales et la réduction en cas de rupture impliquent-elles un effet négatif des PTV (ou de certains types) sur le développement saprophytique du champignon en conditions naturelles ?

- les liaisons PTV - champignon peuvent-elles être rompues de façon durable et avec quel(s) effet(s) pour l'isolat "guéri" ?

En définitive, le "modèle" *G. graminis* - PTV associées, bien connu maintenant au plan des virus et ARN bicaténaires, ne peut plus guère constituer l'une des références importantes de la mycovirologie à objectif agronomique. En conséquence, d'autres approches du déterminisme des modifications du pouvoir pathogène de ce champignon sont à développer et en premier lieu un sérieux approfondissement des connaissances de ses caractères génétiques apparaît très nécessaire.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

ALBOUY J., 1978. Some morphological changes in Fungi induced by fungal viruses, 78-93.
in : MOLITORIS H.P., HOLLINGS M., WOOD H.A. Fungal viruses, XIIth International Congress of Microbiology, Mycol. section, München, Springer Verlag.

ALBOUY J., LAPIERRE H., 1968. Effet de deux inhibiteurs de synthèse protéique sur la multiplication du virus de la Mosaïque du Tabac et du virus de la Mosaïque jaune du Navet. C.R. Acad. Sci. **268**, 220-223.

ALMOND M.R., BUCK K.W., RAWLINSON C.J., 1977. Viruses of *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici*. Abstr. 2nd Int. Mycol. Congr. Tampa, 104.

ALMOND M.R., BUCK K.W. and RAWLINSON C.J. (1978). The virus complex of *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici*. *Bull. Br. mycol. Soc.* 12, 115.

BALIS C., 1970. A comparative study of *Phialophora radicicola*, an avirulent fungal root parasite of grasses and cereals. Ann. appl. Biol., **66**, 59-73.

BANKS G.T., BUCK K.W., CHAIN E.B., HIMMELWEIT F., MARKS J.E., TYLER J.M., HOLLINGS M., LAST F.T., STONE O.M., 1968. Viruses in fungi and interferon stimulation. Nature (London), **218**, 542-545.

BOISSONNET-MENES M., LECOQ H., 1976. Transmission de virus par fusion de protoplastes chez *Pyricularia oryzae*. Physiol. Vég., **14**, 251-257.

.../...

BOUSQUET J.F., 1973. Variation du taux de production de pyriculol dans les filtrats de culture de souches saines ou virosées de *Pyricularia oryzae*. Ann. Phytopathol., 5, 285-288.

BOZARTH R.F., 1975. The problem and importance of transmission of myco-viruses using cell free extracts. Proc. Int. Congr. Virol. (Madrid) Abstr., 148.

BOZARTH R.F., WOOD H.A., NELSON R.R., 1972. Virus-like particles in virulent strains of *Helminthosporium maydis*. Phytopathology, 62, 493.

BROWN M.E., HORNBY D., PEARSON V., 1973. Microbial population and nitrogen in soil in the presence or absence of wheat seedlings. Trans. Br. mycol. Soc., 56, 95-103.

BUCK K.W., ALMOND M.R., Mc FADDEN J.J.P., ROMANOS M.A. and RAWLINSON C.J. (1981). Properties of thirteen viruses and virus variants obtained from eight isolates of the wheat take-all fungus *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici*. J. gen. Virol. 53, 235-245.

BUTLER F.C., 1953. Saprophytic behaviour of some cereal root-rot fungi. I. Saprophytic colonization of wheat straw. Ann. appl. Biol., 40, 284-297.

CASSE F., BOUCHER C., JULLIOT J.S., MICHEL M., DENARIE J., 1979. Identification and characterization of large plasmids in *Rhizobium meliloti* using agarose gel electrophoresis. J. Gen. Microbiol., 113, 229-242.

CASTANHO B., BUTLER E.E., SHEPHERD R.J., 1978. The association of double stranded RNA with *Rhizoctonia solani*. Phytopathology, 68, 1515-1519.

CHAMBERS S.C., 1970. Pathogenic variation in *Ophiobolus graminis*. Aust. J. Biol. sci., 23, 1099-1103.

CHAMBERS S.C., FLENTJE N.T., 1967a. Studies of oat-attackin and wheat attacking isolates of *Ophiobolus graminis* in Australia. Aust. J. Biol. sci., 20, 927-940.

.../...

CHAMBERS S.C., FLENTJE N.T., 1967b. Studies on variation with *Ophiobolus graminis*. Aust. J. Biol. sci., 20, 941-951.

CLARKSON D.T., DREW M., FERGUSON I.B., SANDERSON J., 1975. The effect of the take-all fungus, *Gaeumannomyces graminis* on the transport of ions by wheat plants. Physiol. Plant. Pathol., 6, 75-84.

DAWSON W., POINTER P., 1978. Estimation of the cell-to-cell spread of Tobacco Mosaïc virus infection in mechanically inoculated leaves. Intervirology, 9, 310-315.

DAY P.R.,DODDS J.A., 1979. Viruses of plant pathogenic fungi. In : Viruses and plasmids in fungi. Marcel Dekker Inc., New-York, 653 p.

DAY P.R., DODDS J.A., ELLISTON R.A., JAYNES R.A., ANAGNOSTAKIS S.L., 1977. Double stranded RNA in *Endothia parasitica*. Phytopathology, 67, 1393-1396.

DELHOTAL P., LEGRAND-PERNOT F., LECOQ H., 1976. Etude des virus de *Colletotrichum lindemuthianum*. II. Transmission des particules virales. Ann. Phytopathol., 8, 437-448.

DETROY R.W., WORDEN K.A., 1978. Interactions of fungal viruses and secondary metabolites. XIIth Inter. Cong. Microb., Mycology section, Munich, 94-107.

DIANA G.D., SALVADOR U.J., ZALAY E.S., 1977. Antiviral activities of some β-diketones in vitro activity against both RNA and DNA viruses. J. Med. Chem., 20, 6, 757-761.

DIELEMAN-VAN ZAAYEN A., 1970. Means by which virus disease in cultivated mushrooms is spread and methods to prevent and control it. Mushroom Grovers, Assoc. Bull., 244, 158-178.

DIELEMAN-VAN ZAAYEN A., TEMMINK J.H.M., 1968. A virus disease of cultivated mushrooms in the Netherlands. Neth. J. Plant. Pathol., 74, 48-51.

DUNKLE L.D., 1974. Double stranded RNA mycovirus in *Periconia circinata*. Physiol. Plant. Pathol., 4, 107-116.

FELLOWS H., 1928. Some chemical and morphological phenomena attending infection of the wheat plant by *Ophiobolus graminis*. J. agric. Res., 37, 11, 647-661.

FERAULT A.C., 1980. Les particules de type viral associées à *Gaeumannomyces graminis* (Sacc.) Arx et Olivier. Quelques aspects de leurs relations avec le champignon. Thèse Docteur-Ingénieur INA Paris, 82 pp.

FERAULT A.C., 1981. Les particules de type viral associées à *Gaeumannomyces graminis* (SACC.) Arx et Olivier ; quelques aspects de leurs relations avec le champignon. C.R. Acad. Agri., 67, (5), 435-436.

FERAULT A.C., TIVOLI B., 1983. Mise en évidence de particules de type viral chez *Phialophora radicicola f. graminicola* et étude de leurs relations avec les P.T.V. associées à *Gaeumannomyces graminis*. Agronomie (en préparation).

FERAULT A.C., TIVOLI B., LEMAIRE J.M., SPIRE D., 1979. Etude de l'évolution comparée du niveau d'agressivité et du contenu en particules de type viral d'une souche de *Gaeumannomyces graminis* (Sacc.) Arx et Olivier (*Ophiobolus graminis* Sacc.). Ann. Phytopathol. 11, 2, 185-191.

FERENCZY L., KEVEI F., SZEGEDI M., 1976. Fusion of fungal protoplasts induced by polyethylene-glycol 177-187 in : PEBERDY J.F., ROSE A.H., ROGERS H.J., COCKING E.C. Microbial and plant protoplasts. Academic Press, New-York, San Francisco, London.

FOX M.P., BOPP L.H., 1977. Contact inactivation of RNA and DNA viruses by N-methyl isatin beta-thiosemicarbazone and Cu SO4. Ann. N.Y. Acad. Sci., 284, 533-543.

FRICK L.J., LISTER R.M., 1978. Serotype variability in virus-like particles from *Gaeumannomyces graminis*. Virology, 85, 504-517.

GANDY D.G., 1960. A transmissible disease of cultivated mushroom ("watery stipe"). Ann. appl. Biol., 48, 427-430.

GANDY D.G., HOLLINGS M., 1962. Die-back of mushrooms : a disease associated with a virus. Rep. Glasshouse Crops Res. Inst., 103-108.

GARRETT S.D., 1948. Soil conditions and the take-all disease of wheat. IX. Interaction between host plant nutrition disease escape and disease resistance. Ann. appl. Biol., 35, 14-17.

GARRETT S.D., 1970. Pathogenic root-infecting fungi. Cambridge University press, 294 p.

GHABRIAL S.A., 1980. Effects of fungal viruses on their hosts. Ann. Rev. Phytopathol., 18, 441-461.

GHABRIAL S.A., SANDERLIN R.S., CALVERT L.A., 1979. Morphology and virus like particles content in *Helminthosporium victoriae* colonies regenerated from protoplasts of normal and diseased isolates. Phytopathology, 69, 312-315.

GIBBS A., HARRISON B., 1976. Plant virology. The principles. Edward Arnold, London, 292 p.

GRENTE J., 1980. L'hypovirulence chez l'*Endothia parasitica*. 4ème Réunion Microbiol. INRA, Angers, 129-141.

GRIMALDI G., GUARDIDA J., MARTINI G., 1978. Fungal extrachromosomal DNA and its maintenance and expression in *E. coli*. TIBS, II, 248-249.

HOLLINGS M., 1962. Viruses associated with a die-back disease of cultivated mushroom. Nature (London), 196, 962-965.

HOLLINGS M., 1978. Mycoviruses : Viruses that infect fungi. In : LAUFFER M.A., MARAMOROSCH K., BANG F.B., SMITH K.N. Advances in virus research vol. 22. Academic Press, New-York, San Francisco, London, pp 1-53.

HOLLINGS M., 1982. Mycoviruses and Plant pathology. Plant dis. 66, 12, 1106-1112.

HOLLINGS M., STONE O.M., 1971. Viruses that infect fungi. Annu. Rev. Phytopathol., 9, 93-118.

JADOT R., 1979. L'agressivité de *Gaeumannomyces graminis* testée en conditions artificielles. Variabilité et critères de différenciation. Parasitica, 35, 3, 123-134.

JENKINS P.D., GARETH-JONES D., 1980. Predisposition to *Septoria nodorum* as a result of take-all *(Gaeumannomyces graminis)* infection of wheat. Ann. appl. Biol. 95, 47-52.

KITANO T., HARUNA I., WATANABE I., 1961. Purification and concentration of viruses by an organic solvent system. Virology, 15, 503-504.

KOLTIN Y., LEVINE R., 1978. Fungal viruses and killer factors : *Ustilago maydis* killer proteins. XIIth Intern. Congr. Microb., Mycol. section, Munich, 120-128.

LAPIERRE H., FAIVRE-AMIOT A., 1970. Présence de particules virales chez différentes souches de *Sclerotium cepivorum*. In : Proc. 8th Congr. Int. Prot. Plant., Paris, p 542.

LAPIERRE H., ASTIER-MANIFACIER S., CORNUET P., 1971. Activité RNA-polymérase associée aux préparations purifiées de virus du *Penicillium stoloniferum* C.R. Acad. Sci., 273, 992-994.

LAPIERRE H., LEMAIRE J.M., JOUAN B., MOLIN G., 1970. Mise en évidence de particules virales associées à une perte de pathogénicité chez le Piétin-échaudage des céréales. C.R. Acad. Sci. Paris, 271, 1833-1836.

LAPIERRE H., KUSIAK C., ALBOUY J., MACQUAIRE G., FERAULT A.C., STARON T., 1971. Les inhibiteurs de virus à RNA. Ann. Phytopathol., 3, 1-38.

LECOQ H., FERAULT A.C., 1976. Thermotherapy of a virus infected strain of *Pyricularia oryzae*. Mycovirus Newsletter, 4, 8-9.

LECOQ H., BOISSONNET-MENES M., DELHOTAL P., 1978. Infectivity and transmission of fungal viruses. 34 – 47 in : MOLITORIS H.P., HOLLINGS M., WOOD H.A. Fungal viruses, XIIth International Congress of Microbiology, Mycol. section, München. Springer Verlag.

LEMAIRE J.M., COPPENET M., 1968. Influence de la succession céréalière sur les fluctuations du Piétin-échaudage - *Ophiobolus graminis*. Ann. Epiphyties, 19, 4, 584-599.

LEMAIRE J.M., JOUAN B., 1973. Perspectives de lutte biologique contre les parasites des céréales d'origine tellurique. La lutte contre les maladies des céréales, tome I. C.R. ITCF, 28 février, 65-81.

LEMAIRE J.M., PONCHET J., 1963. *Phialophora radicicola*, forme conidienne du *Linocarpon cariceti*. C.R. Acad. Ag. Fr., 16 octobre, 1067-1069.

LEMAIRE J.M., DEFALQUE J., JOUAN B., 1969. Etude préliminaire sur l'influence du semis en poquets sur l'état sanitaire des céréales. C.R. Acad. Agr. Fr., 19 février, 270-274.

LEMAIRE J.M., LAPIERRE H., JOUAN B., BERTRAND G., 1970. Découverte de particules virales chez certaines souches d'*Ophiobolus graminis* agent du Piétin-échaudage. Conséquences agronomiques prévisibles. C.R. Acad. Agr. Fr., 21 octobre, 1134-1138.

LEMAIRE J.M., DOUSSINAULT G., LUCAS P., PERRATON B., MESSAGER A., 1982. Possibilités de sélection pour l'aptitude à la prémunition dans le cas du Piétin-échaudage des céréales *(Gaeumannomyces graminis)*. Cryptogam. Mycol. 3, 4, 347-359.

LEMAIRE J.M., JOUAN B., COPPENET M., PERRATON B., LECORRE L., 1976. Lutte biologique contre le Piétin-échaudage des céréales par utilisation de souches hypoagressives d'*Ophiobolus graminis*. Sciences Agronomiques, Rennes, 63-65.

LEMAIRE J.M., TIVOLI B., CARPENTIER F., DOUSSINAULT G., FERAULT A.C., PERRATON B. - 1979. Lutte biologique contre le Piétin-échaudage des céréales. 3ème Réunion Microbiologistes INRA. Dijon - Avril 1979, 63-67.

LEMKE P.A., 1979. Viruses and plasmids in fungi. Marcel Dekker Inc., New-York, 653 p.

LEMKE P.A., NASH C.H., 1974. Fungal viruses. Bacteriol. Rev., 38, 29-56.

LEMKE P.A., NASH C.H., PIEPER S.W., 1973. Lytic plaque formation and variation in virus titre among strains of *Penicillium chrysogenum*. J. Gen. Microbiol., 76, 265-275.

LHOAS P., 1970. Use of heterokaryosis to infect virus-free strains of *Aspergillus niger*. Aspergillus Newslett., 11, 8-9.

LHOAS P., 1971. Infection of protoplasts from *Penicillium stoloniferum* with ds-RNA viruses. J. Gen. Virol., 13, 365-367.

LHOAS P., 1972. Mating pairs of *Saccharomyces cerevisiae* infected with ds-RNA viruses from *Aspergillus niger*. Nature (London), 236, 86-87.

L'HOSTIS B., 1982. Contribution à l'étude des Mycovirus :
ARN bicaténaires et particules de type viral chez trois champignons phytopathogènes.
Ceratocystis ulmi (Schw.) C. Moreau
Fusarium oxysporum (Schlecht.) Snyder et Hansen
Endothia parasitica (Murx.) Anderson
Thèse 3ème cycle, Université Paris VI, 52 pp.

LINDBERG G.D., 1959. A transmissible disease of *Helminthosporium victoriae*. Phytopathology, 49, 1, 29-32.

LOCKHART H.C., SEMANCIK J.S., 1968. Inhibition of the multiplication of a plant virus by Actinomycine D. Virology, 36, 504.

MAC GINTY R.M., BUCK K.W., RAWLINSON C.J., 1981. Virus particles and double-stranded RNA in isolates of *Phialophora sp.* with lobed hyphopodia, *Phialophora graminicola* and *Geaumannomyces graminis* var. *graminis* Phytopath. Z., 102, 153-162.

MARINO P., BALDI M.I., TOXCHINI-VALENTINI G.P., 1968. Effect of Rifampycine on DNA-Dependant RNA-polymerase and RNA phage growth. Symposium on quantitative Biology, 33, 125.

MOFFITT E.M., LISTER R.M., 1975. Application of a serological screening test for detecting double-stranded RNA mycoviruses. Phytopathology 65, 8, 851-859.

NOVOTNY J., 1979. Relations entre les champignons *Gaeumannomyces graminis* et *Phialophora radicicola* se développant simultanément en dehors de l'hôte. Zentralbl. Bakteviol. Parasitenkd. Infekt. Hyg. : 2 Abteilung 134, 419-422.

OUTCHERLONY O., 1958. Diffusion in gel methods for immunological analysis. Prog. Allergy, 5, 1-78.

PALLETT I.M., 1972. Production and regeneration of protoplasts from various fungi and their infection with fungal viruses. Abstr. 3rd Symp. Yeast Protoplasts, Salamanca, Spain, p. 78.

PONCHET J., 1982. Réalités et perspectives de la lutte biologique contre les maladies des plantes. Agronomie 2, 4, 305-314.

.../...

PONCHET J., COPPENET M., 1962. Influence de divers facteurs culturaux sur le développement du Piétin-échaudage, *Linocarpon cariceti*. Ann. Epiphyties, 13, 4, 285-291.

POPE A.M.S., JACKSON R.M., 1973. Effects of wheatfield soil on inoculation of *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici*, in relation to take-all decline. Soil biology and biochemistry, 5, 881-890.

PREW R.D., 1980a. Studies on the spread of *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici* in wheat. I. Autonomous spread. Ann. appl. Biol. 94, 391-396.

PREW R.D., 1980b. Studies on the spread of *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici* in wheat. II - the effect of cultivations. Ann. appl. Biol. 94, 397-404.

RAWLINSON C.J., BUCK K.W., 1981. Viruses in *Gaeumannomyces* and *Phialophora spp.*, 151-172 in : ASHER M.J.C., SHIPTON P.J., Biology and control of Take-all, Academic press.

RAWLINSON C.J., MUTHYALU G., 1974. In : Rep. Rothamsted Exp. Stn., Harpenden, Engl., 1973, 119.

RAWLINSON C.J., MUTHYALU G., 1975. In : Rep. Rothamsted Exp. Stn., Harpenden, Engl., 1974, 228.

RAWLINSON C.J., MUTHYALU G., 1976. In : Rep. Rothamsted Exp. Stn., Harpenden, Engl., 1975, 256.

RAWLINSON C.J., MUTHYALU G., DEACON J.W., 1977. Natural transmission of viruses in *Gaeumannomyces* and *Phialophora* spp. (Abstract) 2nd Int. Mycol. Congr., Tampa, Florida, p. 558.

RAWLINSON C.J., HORNBY D., PEARSON V., CARPENTER J.M., 1973. Virus-like particles in the take-all fungus, *Gaeumannomyces graminis*. Ann. appl. Biol., 74, 197-209.

ROCHEFRETTE C., TIVOLI B., BOISSONNET-MENES M., 1979. Obtention de mutants resistants à des fongicides et de mutants auxotrophes obtenus à partir de protoplastes chez *Ophiobolus graminis* Sacc. Etude de leur agressivité et de leur aptitude à prémunir le Blé. Ann. Phytopathol., 11, 1, 43-51.

ROMANOS M.A., BUCK K.W. and RAWLINSON C.J. (1981). A satellite double-stranded RNA in a virus isolated from *Gaeumannomyces graminis*. Fifth International Congress of Virology, Strasbourg, 2-7 August, 1981 (abstract).

ROMANOS M.A., RAWLINSON C.J., ALMOND M.R. and BUCK K.W. (1980). Production of fungal growth inhibitors by isolates of *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici*. Trans. Br. mycol.Soc. 74, 79-88.

SAKSENA K.N., LEMKE P.A., 1978. Viruses in Fungi 103-143 in : Comprehensive Virology 12

SANDERLIN R.S., GHABRIAL S.A., 1978. Physicochemical properties of two distinct types of virus like particles from *Helminthosporium victoriae*. Virology, 87, 142-151.

SCOTT P.R., 1970. *Phialophora radicicola*, an avirulent parasite of wheat and grass roots. Trans. Br. mycol. Soc., 55, 163-167.

SLOPE D.B., COX J., 1964. Continuous wheat growing and the decline of take-all. Rep. Rothamsted Exp. Stn., Harpenden, Engl., 1963, p. 108.

SPIRE D., 1967. Contribution à l'étude sérologique des virus végétaux par la technique de microélectrophorèse en milieu gélosé. Ann. Epiphyt. 18, n° hors-série, 47-63.

SPIRE D., 1972. Les virus de champignons. Mededelingen Fakulteit Landbouw Wetenschappen Gent, 37, 2, 340-352.

THOMPSON R., DAVIS J., RUSSEL P.B., HITCHINGS G.H., 1953. Effect of alyphotic owim and isatin thiosemicarbazone on Vaccinia infection in the mouse and in the rabbit. Proc. Soc. Exper. Biol. Med., 84 496.

TIVOLI B., 1976. Biologie et écologie de différentes souches d'*Ophiobolus graminis* Sacc. Conséquences pour la mise en oeuvre d'une méthode de lutte biologique : la prémunition. Thèse 3ème cycle, Université de Rennes, 421, 125 pp.

TIVOLI B., FERAULT A.C., LEMAIRE J.M., 1979. Interactions entre souches agressives et hypoagressives d'*Ophiobolus graminis* en absence et en présence de l'hôte. Mise en évidence d'échanges entre les souches. Ann. Phytopathol., 11, 2, 177-183.

TIVOLI B., LEMAIRE J.M., JOUAN B., 1974. Prémunition du blé contre *Ophiobolus graminis* par des souches peu agressives du même parasite. Ann. Phytopathol., 6, 4, 395-406.

TIVOLI B., FERAULT A.C., LEMAIRE J.M., SPIRE D., 1979. Agressivité et particules de type viral dans huit isolats monoascosporés de *Gaeumannomyces graminis*. Ann. Phytopathol., 11, 2, 259-261.

VARMA J.P., 1968. Inhibition of Tobacco necrosis virus by guanidine carbonate. Virology, 36, 305.

VISBECQ O., 1979. Essais d'élimination par thermothérapie et chimiothérapie des particules de type viral contenues dans une souche d'*Ophiobolus graminis*. Dipl. Agron. approf., Nancy, 45 p.

VODKIN M.H., ALIANELL G.A., 1978. Fungal viruses and killer factors (*Saccharomyces cerevisiae*). XIIth Inter. Congr. Microbiol., Mycology section, 108-119.

WALKER J., 1973. *Gaeumannomyces graminis* var. *graminis*, var. *avenae* and var. *tritici*. CMI Descriptions of pathogenic Fungi and Bacteria, 381, 382, 383.

WALKER J., 1975. Take-all diseases of Gramineae : a review of recent work. Rev. Plant Pathol., 54, 3, 113-144.

WALKER J., 1981. Taxonomy of Take-all fungi and related genera and species, 15-74, in : ASHER M.J.C., SHIPTON P.J., Biology and control of Take-all, Academic press.

.../...

WELLER D.M., COOK R.J., 1983. Suppression of Take-all of wheat by seed treatments with fluorescent *Pseudomonas*. Phytopathology, 73, 3, 463-469.

WESTE G., 1972. The process of root infection by *Ophiobolus graminis*. Trans. Br. mycol. Soc., 59, 1, 133-147.

WHITE N.H., 1947. The etiology of take-all disease on wheat. III - Factors concerned with the development of take-all symptoms in wheat. J. coun. sc. Ind. Res. Aust., 20, 66-81.

WHITE N.H., Mc INTYRE G.A., 1943. The pathogenicity of single spore isolates of *Ophiobolus graminis* under field conditions. J. coun. sc. Ind. Res. Aust., 16, 93-94.

WICKNER R.B., 1974. "Killer character" of *Saccharomyces cerevisiae* : curing by growth at elevated temperatures. J. Bacteriol., 117, 1356-1357.

WONG P.T.W., 1975. Cross-protection against the wheat and oat take-all fungi by *Gaeumannomyces graminis*. Soil Biology and Biochemistry, 7, 3, 189-194.

WONG P.T.W., 1981. Biological control of Take-all by cross protection, 417 in : ASHER M.J.C., SHIPTON P.J., Biology and control of Take-all, Academic press.

WONG P.T.W., SOUTHWELL R.J., 1980. Field control of take-all of wheat by avirulent fungi. Ann. appl. Biol. 94, 41-49.

LES PARTICULES DE TYPE VIRAL ASSOCIEES A *GAEUMANNOMYCES GRAMINIS* (SACC.) ARX ET OLIVIER

SONT-ELLES RESPONSABLES DE MODIFICATIONS DU POUVOIR PATHOGENE DU CHAMPIGNON ?

André-Christian FERAULT

RESUME

Le travail réalisé pour cette thèse a consisté à envisager les relations entre des modifications biologiques d'isolats de Piétin-échaudage des céréales à paille (*G. graminis* var. *tritici*) et leur contenu en particules de type viral (PTV, de 26 et 35 nm). La confrontation des résultats obtenus indique que :

- les isolats agressifs contiennent ou non des PTV alors que tous les hypoagressifs en renferment.
- le niveau d'agressivité du champignon, conservé *in vitro,* diminue, en un temps variable selon l'isolat. L'apparition des virus accompagne, en la devançant, la réduction de l'agressivité. La quantité relative de PTV croît avec le temps de conservation.
- l'état virosé de la plupart des isolats monoascosporés est compatible avec un degré d'agressivité élevé.

La synthèse virale dépend fortement des conditions de culture du champignon. Les essais d'infection directe de protoplastes d'isolats sans virus, entraînent une dérépression de la réplication virale qui souligne le caractère probablement latent de ces éléments. Les tentatives de ''guérison'' par thermothérapie ou chimiothérapie d'isolats virosés n'aboutissent qu'à une réduction des quantités de PTV présentes. Ces effets cessent avec la suppression de leurs causes.

Des PTV ont été mises en évidence chez *Phialophora radicicola* Cain var. *graminicola* et *radicicola,* forme végétative de *G. graminis* pour certains auteurs. Un type est homologue chez les deux champignons. Des essais de transmission réciproque des PTV, par voie directe, n'ont pas abouti.

L'analyse de nos résultats, largement confrontés à ceux des autres équipes, indique la faiblesse des relations prouvées entre caractères du champignon- notamment les éléments de sa pathogénie - et contenu en particules de type viral. Il reste néanmoins certains constats dont le principal est celui de l'évolution parallèle entre réduction de l'agressivité et quantité croissante de virus.

Au total, le ''modèle'' *G. graminis* - PTV associées, bien connu maintenant au plan des virus, ne peut plus constituer l'une des références importantes de la mycovirologie à objectif agronomique. En conséquence, d'autres approches du déterminisme des modifications du pouvoir pathogène de ce champignon sont à développer.

MOTS CLES

Particules de type viral (P T V)
Mycovirus (virus associés à des champignons)
ARN bicaténaire (ds RNA)
P T V-champignon (relations)
Purification (P T V)
Sérologie (P T V)
Transmission (P T V)
Thermothérapie (isolats virosés)
Chimiothérapie (isolats virosés)
Latent (caractère P T V)

Gaeumannomyces graminis (Sacc.) Arx et Olivier var. *tritici* (souches et isolats)
(*Ophiobolus graminis* Sacc.)
Phialophora radicicola Cain. var. *graminicola* et *radicicola*
Piétin-échaudage (céréales à paille) (''Take-all'')
Déclin (maladie) (''Take-all decline'')
Triticum aestivum L. (Blé tendre)
Pouvoir pathogène (agressivité- hypoagressivité- virulence- hypovirulence)
Mycélium
Fructification sexuée (périthèces- ascospores)
Monoascosporé (isolat)
Protoplastes (*G. graminis* - *P. radicicola*)